

**DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

Registro Calificado según Resolución Número 10544 del Ministerio de Educación Nacional de Colombia (MEN) de Julio 14 20 de 2015.

			
<b>SNIES: 54197</b>	<b>SNIES: 54197</b>	<b>SNIES: 54197</b>	<b>SNIES: 54197</b>

***Sin la publicación, la ciencia está muerta***

Gerard Piel, 1915-2004, ex-editor de *Scientific American*, quien contribuyó a la reinención de la revista y a la redefinición de la era moderna del periodismo científico, citado por Robert A. Day en "How to write and publish a scientific paper", 1998, p. 8.

**UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO  
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD  
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL**

FECHA: Noviembre 10 de 2020

ESTUDIANTE: **JOHN ALEJANDRO ACOSTA DAVILA**

DIRECTOR DEL TRABAJO: Doctor Jorge Enrique Gómez

**TITULO DEL TRABAJO:**

**“Análisis transcriptómico dual *ex-vivo* de células polimorfonucleares de sangre periférica (PBMCs) humanas infectadas con la cepa RH de *Toxoplasma gondii*”**

**EVALUACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN:**

APLAZADO \_\_\_\_\_

APROBADO   X  

MERITORIO \_\_\_\_\_

LAUREADO \_\_\_\_\_

**Jurado 1:**

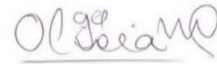
Doctor  
ALONSO ANDRÉS MARIANO, PhD.  
Instituto Tecnológico de Chascomús

**Jurado 2**

Doctor  
CARLOS ANDRES NARANJO, PhD.  
Universidad Autónoma de Manizales

**Jurado 3:**

Doctor  
GUSTAVO ADOLFO VALLEJO, PhD.  
Universidad del Tolima  
Armenia



**Coordinadora del Doctorado:**

Doctora  
OLGA ALICIA NIETO CÁRDENAS PhD  
Universidad del Quindío  
Armenia

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

Registro Calificado según Resolución Número 10544 del Ministerio de Educación Nacional de Colombia (MEN) de Julio 14 20 de 2015.

**ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DUAL *ex-vivo* DE CÉLULAS  
MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMCS) HUMANAS  
INFECTADAS CON LA CEPA RH DE *Toxoplasma gondii***

**TESIS DE GRADO**

**Para optar al título de DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**Presentado por:**

**JOHN ALEJANDRO ACOSTA DÁVILA M.sc.**

**Director:**

**Jorge Enrique Gómez Marín MD. PhD.**

**Co-director:**

**Ailan Farid Arenas M.sc. PhD.**

**Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO**

**Armenia – Quindío**

**2020**



**ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DUAL *ex-vivo* DE CÉLULAS  
MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMCS) HUMANAS  
INFECTADAS CON LA CEPA RH DE *Toxoplasma gondii***

**TESIS DE GRADO**

**Para optar al título de DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**Director:**

**Jorge Enrique Gómez Marín MD. PhD.**

**Co-director:**

**Ailan Farid Arenas M.sc. PhD.**

**Comité Tutorial**

**ALEJANDRA DE LA TORRE PhD.**

**HERNAN LORENZI PhD.**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**Armenia- Quindío**

**2020**

## **DEDICATORIA**

En memoria de mi abuela Georgina Velasco Morales.

## AGRADECIMIENTOS

Dar gracias, entendido como uno de los actos más genuinos del hombre, es entender que no somos uno, sino que somos varios.

Muchas gracias a toda mi familia y amigos, a mi madre Myriam Dávila por impulsarme con su amor, a mi hermano Luis Fernando por su compañía y cariño, a mi pareja y compañera Jessica Alejandra Palacio por su mano y apoyo permanente, a mi director de tesis el Doctor Jorge Enrique Gómez por inculcarme su amor y pasión por la ciencia, a mi Co-Director el Doctor Aylan Farid Arenas por su tiempo, disposición y experiencia, a los jurados el Doctor Carlos Naranjo, el Doctor Andrés Alonso y el Doctor Gustavo Vallejo por la revisión del manuscrito, por sus comentarios, sugerencias y aportes tan valiosos, a el Doctor Hernán Lorenzi y la Doctora Alejandra De la Torre quienes fueron parte de mi comité tutorial y realizaron importantes aportes al diseño del trabajo, a el Doctor Luis Diambra, a la Doctora Sandra Cordo y a la Doctora Cybele García, por aceptarme en sus laboratorios, por su empatía y por enseñarme un valor muy importante en la vida y en la ciencia, el valor de la humildad, a todos los maestros del doctorado, a la Doctora Ingeborg Carvajal y el Doctor Daniel Meneses dupla que cambio mi perspectiva de vida, a el doctor Jhon Carlos Castaño quien fue responsable en gran medida del diseño experimental, al Doctor Leonardo padilla por su ojo critico y comentarios al trabajo, a el Doctor Alejandro Hernández por ser mi compañero académico y de aventuras, a mis compañeros del Doctorado en Ciencias Biomédicas, a la Doctora Olga Alicia por su disposición y acompañamiento, a todos mis compañeros de GEPAMOL y GYMOL, a Mónica Vargas quien aportó en la revisión del manuscrito y en los análisis estadísticos, a Alexandra Elbakyan por romper las barreras de la ciencia, al programa de Doctorado, a Colciencias que financió la beca de doctorado, a la Universidad del Quindío, a la Universidad de Buenos Aires y a la Universidad Nacional de la Plata, a los invisibles y a todos, a todos de nuevo gracias por enseñarme a ser otro.

## RESUMEN

*Toxoplasma gondii* es un parásito que puede invadir cualquier célula del cuerpo humano. Existe una evidencia de que el componente genético del hospedador humano y la estructura genética del parásito desempeñan un papel crucial en la gravedad de la enfermedad. Los mecanismos de interacción y crecimiento de *Toxoplasma* con las células (macrófagos, neuronas, musculares, etc.) en el modelo ratón está bien descrito, pero conocemos muy poco de los mecanismos de infección/interacción en cuanto a la persistencia y la multiplicación del parásito en células humanas. Se han propuesto muchos modelos para estudiar la interacción entre este parásito y las células hospederas. Sin embargo, hay pocos modelos humanos disponibles para estudiar la toxoplasmosis, entre los que destacan las PBMCs humanas como modelo de estudio. Aquí, implementamos y describimos un modelo ex vivo estandarizado con PBMC humanas sin usar suplementos de cultivo / antibióticos y sin células crio-preservadas (**MeExSs**), para estudiar las interacciones entre *T. gondii* y células humanas de personas con toxoplasmosis crónica (ToxoIgG+) y sin Toxoplasmosis (Toxo IgG-). Posteriormente, realizamos el secuenciamiento y la cuantificación tanto de ARN mensajeros humanos como del parásito utilizando el sistema *high-throughput sequencing* (Illumina RNA-Seq Technology). Finalmente, se realizó un análisis bioinformático que permitió identificar genes diferencialmente expresados tanto por parte del hospedador como del parásito. En este estudio presentamos por primera vez para el estudio de la toxoplasmosis un análisis transcriptómico dual en el modelo **MeExSs**, donde se describe la interacción entre *Toxoplasma* y PBMCs-h. Se evidenció que existe una alteración de los perfiles de expresión por la condición IgG+/- de los PBMCs humanos. Los perfiles de expresión, tanto de las células como del parásito indican que la interacción difiere a la presentada de manera general en el modelo murino, por lo que se hace evidente la necesidad de continuar profundizando en la

comprensión tejido-específica y especie específica de la relación entre *Toxoplasma* y sus células hospederas.

Palabras claves: Toxoplasmosis, interacción, genes, transcriptómica, modelo *ex vivo*.

## **SUMMARY**

*Toxoplasma gondii* is a parasite that can invade any cell in the human body. There is evidence that the genetic component of the human host and the genetic makeup of the parasite play a crucial role in the severity of the disease. The mechanisms of interaction and growth of *Toxoplasma* with cells (macrophages, neurons, muscle, etc.) in the mouse model is well described, but we know very little about the mechanisms of infection / interaction in terms of the persistence and multiplication of the parasite in human cells. Many models have been proposed to study the interaction between this parasite and host cells. However, there are few human models available to study toxoplasmosis, among which human PBMCs stand out as a study model. Here, we implement and describe a standardized ex vivo model with human PBMC without using culture / antibiotic supplements and without cryo-preserved cells (MeExSs), to study the interactions between *T. gondii* and human cells from people with chronic toxoplasmosis (ToxoIgG +) and without Toxoplasmosis (Toxo IgG-). Subsequently, we performed the sequencing and quantification of both human and parasite messenger RNAs using the high-throughput sequencing system (Illumina RNA-Seq Technology). Finally, a bioinformatic analysis was carried out that found to identify genes differentially expressed by both the host and the parasite. In this study we present for the first time for the study of toxoplasmosis a dual transcriptomic analysis in the MeExSs model, where the interaction between *Toxoplasma* and PBMCs-h is described. It was evidenced that there is an alteration of the expression profiles due to the IgG +/- condition of human PBMCs. The expression profiles of both the cells and the parasite indicate that the interaction differs from that presented in a general way in the murine model, which is why the need to continue deepening the tissue-specific and species-specific understanding of the relationship between *Toxoplasma* and its host cells.

Key words: Toxoplasmosis, interaction, genes, transcriptomics, ex vivo model.

## **TABLA DE CONTENIDO**

### **1. INTRODUCCIÓN**

### **2. MARCO CONCEPTUAL**

#### **2.1 Características generales de los Apicomplexos**

#### **2.2. Generalidades de *Toxoplasma gondii***

#### **2.3 *Plasticidad* genética de *Toxoplasma gondii***

#### **2.4 Interacción *Toxoplasma*-hospedero**

#### **2.5 Modulación de la respuesta de la célula hospedera**

##### **2.5.1 Respuesta Inmune contra *T. gondii***

#### **2.6 Principales Factores de virulencia en *T. gondii***

##### **2.6.1 ROP16 (GRA15)**

##### **2.6.2 ROP18 (ROP5 y ROP17)**

#### **2.7 Células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs-h) como modelo de estudio en la interacción toxoplasma-humano.**

##### **2.7.1 Modelos experimentales (PBMCs)**

##### **2.7.2 Respuesta inmune en PBMCs estimuladas con *T.gondii***

##### **2.7.3. Aspectos técnicos para considerar antes de trabajar con PBMCs /*T. gondii*.**

#### **2.8 PBMC / Ómicas y Toxoplasma**

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### **4. OBJETIVO GENERAL**

#### **4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

## 5. METODOLOGÍA

## 6. RESULTADOS

**6.1.** Viabilidad de PBMC humanas y análisis de subpoblaciones en condiciones de cultivo *ex vivo* sin suplementos (MExSs).

**6.2.** Ensayo de adhesión y multiplicidad de infecciones de los PBMCs humanos en condiciones *ex vivo*.

**6.3.** Estandarización de las condiciones de Cultivo *ex vivo* de las PBMCs humanas.

**6.4.** Ensayo inmunomodulador.

**6.5.** Análisis de enriquecimiento funcional de los genes diferencialmente expresados (DEGs) en la interacción entre *Toxoplasma gondii* y los PBMCs humanos en un modelo *ex vivo*.

**6.5.1** La interacción entre *T. gondii* RH y los PBMCs humanos es dependiente y variable respecto a la condición Toxo IgG +/- de los PBMCs.

**6.5.2** Comparaciones en número de DEGs entre los PBMCs Crónicos y PBMCs negativos al ser infectados por *T. gondii* en un modelo *ex vivo*.

**6.5.3** El perfil de expresión de los DEGs generados en la interacción *T. gondii* PBMCs humanos difiere respecto al grupo de PBMCs y al tiempo.

**6.5.3.1** El perfil común presentado por los DEGs de PBMCs humanos a las 0 horas (no infectados) vs 1 hora post infección en el modelo *ex vivo*, es un perfil inflamatorio mediado por citoquinas y quimiocinas.

**6.5.3.2** Los DEGs exclusivos en cada grupo de PBMCs (CRO/NEG) presentan perfiles funcionales distintos en la primera hora de interacción.

**6.5.3.4.** Un perfil de respuesta inmune innata y fenómenos inflamatorios son los procesos más enriquecidos en la dinámica (1 hora vs 6 hora pi) en la interacción *Toxoplasma*- PBMCs-h en el modelo *ex vivo*.



**6.5.3.4** Los motivos de unión a factores de transcripción (TFBSs) pueden ser los principales responsables de las diferencias en el enriquecimiento funcional respecto a las diferencias encontradas en la interacción de *T. gondii* con PBMCs CRO frente a PBMCs NEG en la dinámica de 0 horas (no infectados) vs 6 horas pi en un modelo *ex vivo*.

**6.5.3.5** Enriquecimiento funcional de los DEGs sobre expresados (“UP”) y expresados a la baja (“DOWN”) en PBMCs humanos infectados con *T. gondii* en un modelo *ex vivo*.

**6.5.3.6** Los procesos inflamatorios están diferenciados de manera opuesta en PBMCs Crónicos respecto a PBMCs Negativos en la interacción inicial (0 vs 1hpi).

**6.5.3.7** La respuesta Th17 es el perfil común en los DEGs sobre expresados (UP) en PBMCs CRO y NEG en la primera hora de interacción entre PBMCs y *T. gondii*.

**6.5.4** Los DEGs antagónicos son relevantes en la primera hora de la interacción de *T. gondii*-PBMCs pero no en la sexta hpi.

**6.5.5** El factor de transcripción *NFKB* humano se presenta como el factor de transcripción con mayor relación a la respuesta diferenciada en la primera hora de interacción entre PBMCs humanos y *T. gondii* en condiciones *ex vivo*.

**6.5.6** El ciclo celular es la categoría con más diferencias en la sexta hora de interacción entre *T. gondii* y los PBMCs humanos, la biogénesis de ribosomas y una alta actividad mitocondrial son perfiles dominantes comunes en esta dinámica de comparación.

**6.6** Aspectos generales de los genes diferencialmente expresados en *Toxoplasma gondii* en la interacción con PBMCs-h en un modelo *ex vivo*

**6.6.1** *Toxoplasma gondii* RH presenta perfiles de expresión totalmente diferenciados y dependientes del tipo celular (Toxo- IgG+/CRO/ o Toxo IgG-/NEG) en la interacción con PBMCs-h en un modelo *ex vivo*.

**6.6.2** Las proteínas hipotéticas representan un alto número de DEGs presentes en *T. gondii* en la interacción *ex vivo* con PBMCs-h y muchas de ellas son potencialmente secretadas por el parásito.

**6.6.3** En el modelo *ex vivo* no se evidencian “Hot spots” de infección en *T. gondii* al interactuar con PBMCs-h.

## **6.7** DEGs de *Toxoplasma gondii* en PBMCs-h crónicos

**6.7.1.** Rop8, Rop1 y Toxofilin son los principales DEGs sobre expresados por *T. gondii* en la interacción con PBMCs-h CRO en condiciones *ex vivo* en la primera hpi.

**6.7.2.** Pocos cambios son observados en el perfil de genes sobre-expresados en *T. gondii* entre la primera y la sexta hora de interacción con PBMCs-h crónicos.

**6.7.3.** Proteínas provenientes del complejo apical son reguladas a la baja entre la primera y la sexta hora de interacción de *T. gondii* con PBMCs-h crónicos.

**6.7.4.** Un escenario sorprendentemente inalterado en los DEGs de *Toxoplasma* es el resultado de la comparación entre la hora 0 y 6hpi en la interacción con PBMCs-h crónicos.

## **6.8.** DEGs de *Toxoplasma gondii* en PBMCs-h negativos

**6.8.1.** Proteínas provenientes del complejo apical y proteínas de la familia SRS son las principales moléculas sobre -expresadas por *T. gondii* en la primera hora de interacción con PBMCs-h negativos.

**6.8.2.** Reguladores de transcripción AP2 y factores de transcripción de unión a ADN son los principales DEGs a la baja en *T. gondii* durante la primera hora de interacción con PBMCs-h negativos.

**6.8.3.** El metabolismo de Piruvato y la replicación de ADN son los procesos principalmente enriquecidos en los DEGs sobre-expresados en *T. gondii* entre la primera y la sexta hora de interacción con PBMCs-h negativos.

**6.8.4.** Proteínas provenientes del complejo apical (ROPs y RONs) son las principales moléculas que sufren una expresión a la baja en *T. gondii* cuando interactúa con PBMCs-h negativos entre la primera y sexta hora.

**6.8.5.** Un escenario altamente diverso en procesos de síntesis es lo que se relaciona con los DEGs que *T. gondii* sobre expresa en la interacción con PBMCs-h negativos entre la hora 0 y la hora 6 en nuestro modelo *ex vivo*.

**6.8.6.** Proteínas Alveolinas (*Inner Membrane Complex* IMC) y proteínas provenientes del complejo apical (ROPs y RON) son diferencialmente expresadas a la baja en *T. gondii* cuando comparamos la 0 y la sexta hora de interacción con PBMCs-h negativos.

## **7. DISCUSIÓN**

## **8. CONCLUSIONES**

## **9. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES**

## **10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

## **11. ANEXOS**

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Porcentaje de viabilidad de PBMC humanas en condiciones de cultivo *ex vivo*.

**Figura 2.** Porcentaje de subpoblaciones de PBMC humanas en condiciones de cultivo *ex vivo*.

**Figura 3.** Porcentaje de adhesión de PBMC humanas a la placa en condiciones de cultivo *ex vivo*.

**Figura 4.** Comparación a lo largo del tiempo de infección de PBMC humanas con *T. gondii* RH-GFP en condiciones de cultivo *ex vivo*.

**Figura 5.** RT-PCR- Visualización de la expresión del gen GAPDH humano y el gen RE de *T. gondii*.

**Figura 6.** Comparación de los diferentes MOI de infección en células HFF (1:1, 1:3 y 1:5) bajo el tratamiento con PBMCs de 1 individuo negativo y 1 individuo positivo para *Toxoplasma gondii*.

**Figura 7.** Diagramas de Venn de los genes diferencialmente expresados (DEGs) en PBMCs humanos (Foldchange  $\geq 2$ ).

**Figura 8.** Resumen de el análisis de RNA-seq de PBMCs-h infectados con *T. gondii* RH en **MEexSs**

**Figura 9.** Resumen del análisis de RNA-seq DEGs UP y DOWN en **0h vs 1 hpi** en PBMCs-h infectados con *T. gondii* RH en **MEexSs**

**Figura 10.** Análisis de enriquecimiento funcional de los DEGs humanos (42) compartidos entre los PBMCs Crónicos y PBMCs Negativos en la primera hora de infección por *T. gondii* (**gProfiler**).

**Figura 11.** Análisis de la interacción Proteína - Proteína realizada en el servidor **STRING** (índice:0.7) de los (42) DEGs humanos compartidos entre

los PBMCs Crónicos y PBMCs Negativos en la primera hora de infección por *T. gondii*.

**Figura 12. REACTOMA:** Análisis de enriquecimiento funcional de los DEGs de los PBMCs humanos (42) compartidos entre los PBMCs Crónicos y PBMCs Negativos en la primera hora de infección por *T. gondii*.

**Figura 13.** Análisis de enriquecimiento funcional de los DEGs humanos (156) que solo se presentan en los PBMCs Crónicos en la primera hora de infección por *T. gondii* (**g: Profiler**).

**Figura 14.** Análisis de la interacción Proteína - Proteína realizada en el servidor **STRING** (índice:0.7) de los (156) DEGs humanos que solo se presentan en los PBMCs en la primera hora de infección por *T. gondii*.

**Figura 15. REACTOMA:** Comparación del Análisis de enriquecimiento funcional de los DEGs de PBMCs humanos exclusivos en los PBMCs crónicos (156, **Figura A**) frente a los DEGs humanos exclusivos en los PBMCs negativos (79, **Figura B**) en la primera hora de infección por *T. gondii*.

**Figura 16.** Análisis de enriquecimiento funcional de los DEGs humanos (79) que solo se presentan en los PBMCs negativos en la primera hora de infección por *T. gondii* (**g: Profiler**).

**Figura 17.** Análisis de la interacción Proteína - Proteína realizada en el servidor **STRING** (índice:0.7) de los (79) DEGs humanos que solo se presentan en los PBMCs negativos en la primera hora de infección por *T. gondii*.

**Figura 18.** Análisis de enriquecimiento funcional de los DEGs humanos (542) compartidos entre los PBMCs Crónicos y PBMCs Negativos entre la primera hora y la sexta hora post-infección de *T. gondii* (**g: Profiler**).

**Figura 19. REACTOMA:** Análisis de enriquecimiento funcional de los DEGs humanos (542) compartidos entre los PBMCs Crónicos y PBMCs Negativos al comparar la primera y sexta hora post-infección con *T. gondii*.

**Figura 20.** Análisis de la interacción Proteína – Proteína realizada en el servidor **STRING** (índice:0.9) de los (542) DEGs humanos en PBMCs compartidos en Crónicos y Negativos al comparar la primera y la sexta hora post - infección con *T. gondii*.

**Figura 21.** Análisis de enriquecimiento funcional de los DEGs humanos (501) que solo se presentan en los PBMCs Crónicos cuando se compara la hora primera hora versus la sexta hora de infección con *T. gondii* (**g: Profiler**).

**Figura 22.** Análisis de la interacción Proteína – Proteína realizada en el servidor **STRING** (índice:0.9) de los (501) DEGs humanos en PBMCs Crónicos que se presentan al comparar la primera y la sexta hora post - infección con *T. gondii*.

**Figura 23.** Análisis de enriquecimiento funcional de los DEGs humanos (613) que solo se presentan en los PBMCs Negativos cuando se compara la hora primera hora versus la sexta hora de infección con *T. gondii* (**g: Profiler**).

**Figura 24.** Análisis de la interacción Proteína – Proteína realizada en el servidor **STRING** (índice:0.9) de los (613) DEGs humanos en PBMCs negativos que se presentan al comparar la primera y la sexta hora post - infección con *T. gondii*.

**Figura 25.** Comparación de los perfiles de enriquecimiento funcional de los DEGs de los PBMCs humanos sin infectar (0 horas) versus los mismos PBMCs a la sexta hora post-infección con *T. gondii* (**g: Profiler**).

**Figura 26. A. REACTOMA:** Análisis de enriquecimiento funcional de los DEGs humanos (1287) exclusivos en los PBMCs Crónicos entre las 0 horas (sin infectar) y las 6 horas post-infección con *T. gondii*.

**Figura 27.** Análisis de enriquecimiento de la interacción Proteína – Proteína realizada en el servidor **STRING** (índice:0.9) de los (828) DEGs humanos exclusivos en PBMCs negativos infectados por *T. gondii*, la comparación ocurre entre las 0 horas (sin infectar) y las 6 horas post-infección.

**Figura 28.** Análisis de enriquecimiento de la interacción Proteína – Proteína realizada en el servidor **STRING** (índice:0.9) de los (1329) DEGs compartidos en PBMCs humanos negativos y crónicos para *T. gondii*, la comparación ocurre entre las 0 horas (sin infectar) y las 6 horas post-infección.

**Figura 29.** Análisis de enriquecimiento funcional de los DEGs “DOWN” (103) en los PBMCs Crónicos al comparar las células sin infectar (0 hora) versus la primera de infección por *T. gondii* (**g: Profiler**).

**Figura 30.** Análisis de enriquecimiento funcional de los DEGs “UP” (94) en los PBMCs Crónicos al comparar las células sin infectar (0 hora) versus la primera de infección por *T. gondii* (**g: Profiler**).

**Figura 31.** Análisis de enriquecimiento funcional de los DEGs “DOWN” (47) en los PBMCs Negativos al comparar las células sin infectar (0 hora) versus la primera de infección por *T. gondii* (gProfiler).

**Figura 32.** Análisis de enriquecimiento funcional de los DEGs “UP” (74) en los PBMCs Negativos al comparar las células sin infectar (0 hora) versus la primera de infección por *T. gondii* (gProfiler).

**Figura 33.** Diagramas de Venn de los (DEGs) que se sobre expresan (UP) al comparar PBMCs sin estimular (tiempo 0) versus estimulados a la 1 hora pi, en crónicos y negativos. (Foldchange  $\geq 2$ ).

**Figura 34.** Análisis de enriquecimiento funcional de los DEGs humanos “UP” (14) compartidos al comparar las células sin infectar (0 hora) versus la primera hora de infección por *T. gondii* (**g: Profiler**).

**Figura 35.** Diagramas de Venn de los (DEGs) humanos que se sobre expresan (DOWN) al comparar PBMCs sin estimular (tiempo 0) versus estimulados a la 1 hora pi, en crónicos y negativos. (Foldchange  $\geq 2$ ).

**Figura 36. A:** Análisis de enriquecimiento funcional de los DEGs humanos “DOWN” (7) compartidos entre los PBMCs sin infectar (0 hora) y la primera hora de infección por *T. gondii* (**g: Profiler**).

**Figura 37.** Resumen del Análisis de RNA-seq de DEGs Antagónicos **0h vs 1 hpi** en PBMCs-humanos infectados con *T. gondii RH* en **MEexSs**

**Figura 38.** Resumen Análisis de RNA-seq DEGs Antagónicos 0h vs 6hpi en PBMCs-h infectados con *T. gondii RH* en **MEexSs**

**Figura 39. A:** Diagramas de Venn de los (DEGs) humanos antagónicos (sobre expresados UP en crónicos y expresados a la baja DOWN en negativos) al comparar PBMCs sin estimular versus estimulados a la 1 hora pi.

**Figura 40.** Análisis de enriquecimiento funcional de los (DEGs) humanos antagónicos (sobre expresados UP en crónicos y expresados a la baja DOWN en negativos) al comparar PBMCs sin estimular (tiempo 0) versus estimulados a la 1 hora pi (gProfiler).

**Figura 41.** Diagramas de Venn de los (DEGs) antagónicos (sobre expresados UP en PBMCs negativos y expresados a la baja DOWN en Crónicos) al comparar PBMCs sin estimular (tiempo 0) versus estimulados a la 1 hora pi. (Foldchange  $\geq 2$ ).



**Figura 42.** Análisis de enriquecimiento funcional de los (DEGs) antagónicos (expresados UP en negativos y expresados DOWN en Crónicos) al comparar PBMCs sin estimular (tiempo 0) versus estimulados a la 1 hora pi (**g: Profiler**).

**Figura 43.** Análisis de enriquecimiento de factores de transcripción de los 17 DEGs humanos antagónicos (UP en CRO, DOWN en NEG) presentes en la primera hora de interacción entre *T. gondii* y PBMCs humanos.

**Figura 44.** Análisis de enriquecimiento de factores de transcripción de los 4 DEGs humanos antagónicos (UP en NEG, DOWN en CRO) presentes en la primera hora de interacción entre *T. gondii* y PBMCs humanos.

**Figura 45.** Análisis de enriquecimiento de la interacción Proteína – Proteína realizada en el servidor **STRING** (índice:0.9) de los DEGs humanos UP NEG (937) y los DEGs DOWN NEG (1298) al comparar 0 y 6 hpi.

**Figura 46.** Análisis de enriquecimiento de la interacción Proteína – Proteína realizada en el servidor **STRING** (índice:0.9) de los (1369) DEGs humanos UP y DOWN (1294) CRO al comparar 0 y 6 hpi.

**Figura 47.** Resumen del Análisis de RNA-seq, DEGs de *T. gondii* RH al infectar PBMCs-h

**Figura 48.** Resumen de el perfil de expresión de genes de *T. gondii* es dependiente de la condición IgG+/- de los PBMC-h en el modelo **MExSs**

**Figura 49:** Diagramas de Venn de los genes diferencialmente expresados (DEGs) en *T. gondii* en la interacción con PBMCs-h en condiciones *ex vivo*.

**Figura 50.** Análisis de enriquecimiento de componente celular en los 145 DEGs sobre expresados por *T. gondii* en la interacción con PBMCs-h negativos.

**Figura 51.** Análisis de enriquecimiento de componente celular en los 169 DEGs expresados a la baja por *T. gondii* en la interacción con PBMCs-h negativos.

**Figura 52. A:** Análisis de enriquecimiento metabólico en los 150 DEGs sobre-expresados en *T. gondii* al interactuar con PBMCs-h negativos entre la primera y la sexta hora.

**Figura 53.** análisis de enriquecimiento de los 88 DEGs a la baja en *T. gondii* al interactuar con PBMCs-h entre la primera y la sexta hora.

**Figura 54.** Análisis de enriquecimiento metabólico de los 293 DEGs sobre expresados en *T. gondii* en la interacción con PBMCs negativos en la hora 0 vs la hora 6.

**Figura 55.** Análisis de enriquecimiento de componente celular de los 293 DEGs sobre expresados en *T. gondii* en la interacción con PBMCs negativos en la hora 0 vs la hora 6.

**Figura 56.** Análisis de enriquecimiento de los 182 DEGs presentes en *T. gondii* durante la interacción con PBMCs-h negativos en un modelo *ex vivo*.

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Número de genes diferencialmente expresados en PBMCs de individuos crónicos y seronegativos en la interacción con *T. gondii* en un modelo *ex vivo*.

**Tabla 2.** Lista de DEGs humanos que son compartidos en CRO y NEG en la primera hora de interacción entre *T. gondii* y los PBMCs humanos.

**Tabla 3.** Lista de DEGs humanos que son exclusivos en CRO en la primera hora de interacción entre *T. gondii* y los PBMCs humanos.

**Tabla 4.** Lista de DEGs humanos que son exclusivos en NEG en la primera hora de interacción entre *T. gondii* y los PBMCs humanos.

**Tabla 5.** Análisis de enriquecimiento de los motivos de unión a factores de transcripción humanos asociados a los DEGs encontrados en cada condición.

**Tabla 6.** Lista de genes diferencialmente sobre-expresados (UP) en PBMCs humanos al ser infectados con *T. gondii* en un modelo *ex vivo* durante la primera hora de infección.

**Tabla 7.** Lista de genes diferencialmente expresados a la baja (DOWN) en PBMCs humanos al ser infectados con *T. gondii* en un modelo *ex vivo* durante la primera hora de infección.

**Tabla 8.** Lista de genes antagónicos 1: (diferencialmente expresados (UP) en Crónicos y expresados a la baja (DOWN) en PBMCs negativos al ser infectados con *T. gondii* en un modelo *ex vivo*, durante la primera hora de infección.

**Tabla 9.** Lista de genes antagónicos diferencialmente expresados UP en Negativos y expresados a la baja DOWN en PBMCs Crónicos al ser infectados con *T. gondii* en un modelo *ex vivo*, durante la primera hora de infección.

**Tabla 10.** Análisis de presencia de “proteínas hipotéticas” y presencia de péptido señal en la interacción *ex vivo* de *Toxoplasma* y PBMCs-h.

**Tabla 11.** DEGs de *Toxoplasma gondii* RH sobre-expresados en la primera hora de interacción en PBMCs-h crónicos.

**Tabla 12.** DEGs de *T. gondii* sobre expresados (UP) en la interacción con PBMCs-h crónicos en un modelo *ex vivo*.

**Tabla 13.** Principales proteínas asociadas a los DEGs expresados a la baja (DOWN) en *T. gondii* entre la primera y la sexta hora de interacción con PBMCs-h crónicos.

**Tabla 14.** Principales familias de proteínas asociadas a los DEGs de *T. gondii* en la interacción con PBMCs-h negativos en la primera hora pi.

**Tabla 15.** DEGs expresados a la baja en *T. gondii* que son relacionados a la categoría “regulación de la transcripción” en la primera hora de interacción con PBMCs-negativos en un modelo *ex vivo*.

## LISTA DE ANEXOS

**ANEXO 1.** *Acosta Dávila JA and Hernandez De Los Rios A (2019). An Overview of Peripheral Blood Mononuclear Cells as a Model for Immunological Research of Toxoplasma gondii and Other Apicomplexan Parasites. Front. Cell. Infect. Microbiol. 9:24. doi: 10.3389/fcimb.2019.00024.*

**ANEXO 2.** Extracción y visualización de ARN Total del modelo de PBMCs humanos infectados con *Toxoplasma gondii*

**ANEXO 3.** Cuantificación de ARN total del modelo de infección *ex vivo* en PBMCs infectados con *T. gondii*.

**ANEXO 4.** Crecimiento y proliferación de *Toxoplasma gondii* RH-GFP en cultivo celular de células HFF.

**ANEXO 5.** Inmunofluorescencia de la infección por *T. gondii* RH-GFP a PBMC humanas en un modelo en condiciones *ex vivo*.

**ANEXO 6:** Diagrama general de la metodología utilizada en análisis de mapeo y generación de genes diferencialmente expresados DEGs

**ANEXO 7.** Resultados consolidados del proceso RNA-seq y del mapeo con valores de calidad de cada una de las muestras.

**ANEXO 8.** Lista de DEGs (542) compartidos en CRO/NEG en la dinámica 1 vs 6 hpi.

**ANEXO 9.** Lista de 501 DEGs exclusivos en CRO en la dinámica 1 vs 6 hpi.

**ANEXO 10.** Lista de 613 DEGs exclusivos en NEG en la dinámica 1 vs 6 hpi.

**ANEXO 11.** Lista de 1287 DEG sen CRO en la dinámica 0 vs 6 hpi.

**ANEXO 12.** Lista de DEGs (828) exclusivos en NEG en la dinámica 0 vs 6 hpi.

**ANEXO 13.** Lista de DEGs (1329) compartidos en NEG y CRO en la dinámica 0 vs 6 hpi.

**ANEXO 14.** Comparación en búsqueda de DEGs antagónicos en la dinámica 0 vs 6 hpi.

**ANEXO 15.** Artículo publicado en la revista *Experimental Parasitology*.

**ANEXO 16.** DEGs "hipotéticas" en *T. gondii*.

**ANEXO 17.** Distribución cromosómica de los DEGs presentados por *Toxoplasma gondii* en la interacción con PBMCs-h negativos en un modelo *ex vivo*.

**ANEXO 18.** DEGs de *T. gondii* expresados a la baja en la interacción con PBMCs crónicos entre la primera y la sexta hora pi.

**ANEXO 19.** Lista de los 145 DEGs sobre expresados en *T. gondii* en la interacción con PBMCs-h negativos en la 0 vs 1hpi.

**ANEXO 20.** DEGs (169) de *Toxoplasma gondii* presentes en la primera hora de interacción con PBMCs-h negativos, posterior a la eliminación de las DEGs "hipotéticos".

**ANEXO 21.** Lista de los 150 DEGs sobre expresados en *T. gondii* al interactuar con PBMCs-h negativos entre la primera y la sexta hpi.

**ANEXO 22.** DEGs asociados a la ruta del metabolismo de piruvato sobre expresados en *T. gondii* entre la primera y la sexta hora al interactuar con PBMCs-h negativos.

**ANEXO 23.** DEGs sobre expresados en *T. gondii* entre la primera y la sexta hora al interactuar con PBMCs-h negativos, asociados al proceso de replicación de ADN.

**ANEXO 24.** DEGs de *T. gondii* expresados a la baja en la interacción con PBMCs-h negativos en la primera y la sexta hora.

**ANEXO 25.** DEGs a la baja en *T. gondii* entre la primera y la sexta hora al interactuar con PBMCs-h negativos, mostrando los 21 DEGs provenientes del complejo apical.

**ANEXO 26.** DEGs sobre expresados en *T. gondii* entre la 0 y 6 hpi en NEG.

**ANEXO 27.** Lista de DEGs putativos sobre expresados por *T. gondii* en la interacción con PBMCs-h negativos entre la primera y la sexta hpi.

**ANEXO 28.** Lista de los principales grupos de moléculas asociadas a los DEGs sobre expresados en *T. gondii* al interactuar con PBMCs-h negativos entre la hora 0 y la hora 6.

**ANEXO 29.** Lista de los DEGs expresados a la baja en *T. gondii* entre la hora 0 y la hora 6 al interactuar con PBMCs-h negativos.

**ANEXO 30.** Principales familias asociadas a los DEGs a la baja en *T. gondii* al interactuar con PBMCs-h entre las 0 y 6 hpi.

**ANEXO 31.** Factores de transcripción mas relevantes en los DEGs resultantes de la interacción PBMCs humanos –*Toxoplasma gondii* en 0h vs 6 hpi en **MeExSs**.

**ANEXO 32.** ACTA DE APROBACIÓN DEL COMITÉ DE BIOÉTICA.

**ANEXO 33.** Ejemplo (muestra A21) de control de calidad del rango de error de las lecturas en los transcriptomas.

**ANEXO 34.** Ejemplo (muestra A21) de control de calidad del contenido de bases en los transcriptomas.

**ANEXO 35.** Ejemplo (muestra A21) de control de calidad de la clasificación de las lecturas en los transcriptomas.

**ANEXO 36.** Ejemplo (muestra A21) de control de calidad de la distribución de de las lecturas en los en los cromosomas humanos

**ANEXO 37.** Ejemplo (muestra A21) de control de calidad del porcentaje exonico de las lecturas en los transcriptómas humanos.

**ANEXO 38.** Constancia de Pasantía en Universidad Nacional de la Plata, Argentina.

**ANEXO 39.** Constancia de pasantía en la universidad de Buenos Aires.

**ANEXO 40.** Portada artículo publicado como resultado de la pasantía en la Universidad de Buenos Aires.

**ANEXO 41.** Certificado del premio obtenido en la ACIN 2020.

**ANEXO 42.** Certificado de curso sobre transcriptómica y RNAseq.

**ANEXO 43.** Certificado de socialización de avances del trabajo en el XI Encuentro ACIN.

**ANEXO 44.** Certificado de socialización de avances del trabajo en el Bogotá Microbial meeting.

**ANEXO 45.** Consentimiento informado

**Anexo 46.** Diplomado en Bioetica.



## **ABREVIACIONES**

**PBMCs:** Células mononucleares de sangre periférica.

**PBMCs-h:** Células mononucleares de sangre periférica humana.

**HFF:** Fibroblastos humanos

**IL-1 $\beta$ :** Interleucina 1 beta.

**IL-10:** Interleucina 10.

**IFN- $\gamma$ :** Interferón gamma.

**SFB:** suero fetal bovino.

**CRO:** Individuos crónicos asintomáticos

**NEG:** Individuos negativos para *T. gondii*

**STAT3:** Transductor de señal y activador de la transcripción 3

**STAT6:** Transductor de señal y activador de la transcripción 6

**MOI:** Multiplicidad de la infección

**VP:** Vacuola parasitófora

**NK:** Células asesinas naturales

**GBPs:** Proteínas de unión a guanilato

**ROP:** Proteínas secretadas por las roptrias

**RON:** Proteínas del cuello de las roptrias

**RNA-seq:** secuenciación de ARNm

**MHC I y II:** complejo de histocompatibilidad I y II

**ToxoDB:** Toxoplasma Data Base

**CD8, CD4:** Cluster of Differentiation (linfocitos con diferenciación 8 y 4)

**Th1 y Th2:** T helper response (respuesta ayudadora 1 y 2)

**GO:** ontología génica

**MTs:** Microtúbulos

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ADN:** Ácido desoxiribonucleico.

**SAGs:** ("surface antigens"), antígenos de superficie

**GPI:** glucosilfosfatidilinositol

**SRSs:** ("SAG1-related sequences"), secuencias relacionadas a SAG.

**KEEG:** Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto.

**SUSAs:** ("SAG-unrelated surface antigens"), secuencias de antígenos no relacionados a SAG.

**CDPK:** Proteínas-quinasas calcio dependientes.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.

**MIC:** Micronemas.

**RON:** ("rhoptry neck proteins"), proteínas del cuello de las roptrias.

**AMA1:** ("apical membrane antigen"), antígeno de membrana apical.

**VP:** Vacuola parasitófora.

**MVP:** membrana de la Vacuola parasitófora.

**PBS:** solución salina tamponada con fosfato.

**GRAs:** Proteínas de los granulos densos.

**M1:** Macrófagos tipo 1.

**M2:** Macrófagos tipo 2.

**ON:** Oxido nítrico

**FPKMs:** Fragmentos por kilobase por millón de fragmentos mapeados.

***T. gondii*-GFP:** *T. gondii* transfectado con la proteína verde fluorescente.

**TLA:** Antígeno-lisado total.

**IFs:** Filamentos intermedios

**SOCS:** supresores de señalización de citoquinas.

**IVN:** red intravacuolar de membranas.

**IMCs:** Proteínas del complejo de membrana interna.

**GO: BP** Ontología de genes : Procesos Biológicos.

**GO:MF** Ontología de genes Función molecular.

**KEEG:** Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto.

**REAC:** Reactoma.

**TF:** Web Server Transfactor para evaluación de motivos de unión a factores de transcripción.

**MIRNA:** Micro RNAs.

**MyoA/B:** Proteínas Miosinas A y B.

**JAKs:** Proteínas Janus Kinasas.

**Arg-I:** Arginina I.

**NFKB:** Complejo proteico que controla la transcripción del ADN.

**YO-PRO-1/7-AAD:** Método de detección de apoptosis.

**GTPasas:** Familia de proteínas que participan en la transducción de señales.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Toxoplasma gondii* es un parásito intracelular obligado que invade y se replica en casi todas las células nucleadas de la gran mayoría de vertebrados. *T. gondii* es el segundo patógeno más importante de transmisión alimentaria generando importantes pérdidas económicas y un detrimento en la calidad de vida de las personas infectadas, especialmente en personas inmunocomprometidas. La infección por este parásito es una de las principales causas de discapacidad visual en pacientes de numerosos países, siendo Colombia uno de los países donde más casos se reportan. El éxito atribuido a este parásito se debe a sus sofisticados mecanismos de supervivencia que este establece en el interior de la célula que invade. *Toxoplasma* tiene la capacidad de modular y controlar la respuesta inmune del hospedero a través de la secreción de proteínas que intervienen en las vías de señalización que inician la transcripción de los genes encargados de la respuesta inflamatoria y anti-*Toxoplasma* de la célula hospedera. Lo que mejor se conoce acerca de la modulación de ARN mensajeros de genes del hospedador por *Toxoplasma* han sido realizados en el modelo ratón, tal es el caso en el que el gen que codifica la proteína ROP18 (cinasa activa) se une al gen que codifica la proteína ROP5 (pseudocinasa) y cooperativamente (ROP18 y ROP5) inhiben las proteínas IRGs (GTPasas inducidas por interferón). Dichas proteínas IRGs están encargadas de destruir la membrana de la vacuola parasitofora (PVM) y conducir finalmente a la destrucción del parásito desde interior de la célula, sin embargo este mecanismo no es funcional en los humanos debido a que no cuenta con proteínas IRGs inducibles para interferon. Lo anterior es solo un ejemplo que indica que el modelo raton es un modelo limitado para inferir respecto a lo que pueda estar sucediendo en el humano, de hecho comparado con el raton, el ser humano es mas resistente a *Toxoplasma gondii*. Todo este panorama indica que la combinación de estos y otros efectores secretados

por toxoplasma determinan en gran medida su capacidad de virulencia y fundamentalmente la estrategia de modulación de las rutas de señalización por parte del hospedador que pueden, inclusive, llegar a estar asociadas con el desenlace clínico. También es muy escasa la información proveniente de modelos mucho más cercanos al ser humano, de hecho, la mayoría de esta información se ha obtenido por modelos celulares en líneas humanas de laboratorios, como las células endoteliales, células dendríticas o las células HFF (*human foreskin fibroblast*) y es mucho más limitada la información de estudios en células humanas provenientes de individuos que padecen la enfermedad. Por lo tanto, se hace necesario conocer los genes humanos relacionados con la inmunidad que son alterados en su expresión durante la estimulación/infección del parásito, tal como puede ocurrir en las reactivaciones de los individuos con toxoplasmosis de lo cual se desconoce ampliamente sus causas. Adicionalmente, se hace importante conocer si existe un comportamiento diferencial por parte del parásito frente a PBMCs provenientes de diferentes formas clínicas. Actualmente el reto es aproximarse en un contexto más preciso y complejo respecto a la infección en humanos que están siendo afectados por este parásito, por lo que en los últimos años, la tecnología RNA-seq se ha considerado como una técnica altamente eficaz, de bajo precio (accesible) y ha empezado a ser utilizada en la investigación de muchas enfermedades infecciosas incluida la toxoplasmosis, siendo los análisis duales por RNA-seq una muy buena oportunidad para permitir conocer los genes y rutas de comunicación celular que están siendo moduladas por *Toxoplasma* en los seres humanos.

## 2. MARCO CONCEPTUAL

### 2.1 Características generales de los Apicomplexos

Los Apicomplexa son un *phylum* que comprende más de 5.000 protozoos que son casi exclusivamente parásitos intracelulares obligados de animales vertebrados e invertebrados (1). Dicho grupo de organismos son caracterizados por la presencia de una estructura conocida como el "complejo apical," del cual se inspiró el nombre del *Phylum* (2). Dicha estructura tiene un papel preponderante para este grupo de parásitos, dado que en este extremo apical existe un grupo de orgánulos entre los que se encuentran una red de complejos tubulares llamados micronemas, que contienen las moléculas necesarias para interactuar con la célula huésped y contener generalmente toda la maquinaria de adhesión. Durante la invasión los Apicomplexos parecen fusionar y utilizar ampliamente otro orgánulo del complejo apical conocido como las roptrias que al descargar su contenido ayudan además de la invasión, en la modulación de la respuesta inmunológica al parásito. Otra característica distintiva en los Apicomplexos es el apicoplasto, que es un orgánulo degenerado fotosintético que desciende de una endosimbiosis secundaria de un eucariota, probablemente de ascendencia de rodófitas (3). Los Apicomplexa poseen una movilidad única dependiente del sustrato que no es fundamentada en orgánulos como flagelos o en cambios en la estructura de membrana como los pseudópodos, la movilidad requiere del reconocimiento de la membrana del hospedador y el enganche por proteínas como las adhesinas que contengan dominios conservados, tales como trombospondina 1 (TSR), Von Willerbrand, PAN, EGF, lectinas entre otras (4). Esta movilidad es posible gracias a un complejo llamado glideosoma, conformado por un motor de actina-miosina, adhesinas, y proteasas. Este complejo macromolecular le permite deslizarse (en inglés: *gliding*) lo cual es crucial para el establecimiento de la infección e invasión por la mayoría de

parásitos Apicomplexa. El mecanismo de desplazamiento parasitario permite la migración a través de barreras biológicas, la invasión de células y la salida de las células hospedadoras (5).

## **2.2 Generalidades de *Toxoplasma gondii***

*T. gondii* es un protozooario ubicuo que pertenece al filo Apicomplexa, *T. gondii* fue inicialmente aislado del roedor *Ctenodactylus gundii* por Nicolle y Manceaux en 1908. El nombre del parásito está dado por su morfología (*tox*→arco, *plasma*→vida) y *gondii* por el hospedero roedor en el cual se aisló por primera vez (6). *T. gondii* se agrupa con otros parásitos de gran importancia médica y veterinaria como *Plasmodium*, *Cryptosporidium*, *Babesia* y *Neospora*. Aunque este grupo de parásitos comparten varias características estructurales, una de las principales características de *T. gondii* es su amplio espectro de hospederos y células que puede invadir y replicarse, incluyendo al hombre, donde puede causar la toxoplasmosis humana (7).

Se ha estimado que hasta en un tercio de la población humana está infectada con *T. gondii*. La prevalencia global de *Toxoplasma* es en su mayor parte es el resultado de su ciclo biológico increíblemente flexible, dos rutas principales de transmisión existen en la naturaleza (sexual y asexual) y tres diferentes formas para el desarrollo (esporozoitos, bradizoitos y taquizoitos) mediante colonización, diseminación y la transmisibilidad de la infección para un vasto conjunto de anfitriones susceptibles (8). La toxoplasmosis es una de las enfermedades zoonóticas más conocida y más extendida en todo el mundo. El parásito también es considerado como un patógeno de transmisión alimentaria generando importantes pérdidas económicas a nivel global (9). Este se trasmite a humanos por el consumo de agua que puede estar contaminada con ooquistes (10), o por la ingestión de quistes tisulares especialmente en carne de consumo humano (11). Esta enfermedad también causa problemas en otras especies salvajes en todo el mundo, y posiblemente

se originó primero en estas especies de vida silvestre y posteriormente pasó a estar bien establecida como una enfermedad humana. Por estos motivos, la toxoplasmosis está recibiendo cada vez más atención como parte de las enfermedades emergentes (9).

A pesar de ser una especie modelo del grupo, *T. gondii* posee la cualidad de infectar a sus hospedadores sin necesidad de estar en su estado sexual (ooquistes, o esporozoito) e infectar células nucleadas de vertebrados. En la infección, *T. gondii* (haploide) se multiplica asexualmente y luego se desarrolla en una etapa “crónica” (bradizoito) que persiste hasta la muerte del anfitrión, pero que puede iniciar una nueva infección por la ingesta de un depredador o un animal carroñero. Su fase sexual ocurre en el intestino de félidos y después de su excreción al ambiente en las heces, el ooquiste experimenta meiosis y produce dos esporozoitos, cada uno conteniendo cuatro esporozoitos haploides. La reproducción sexual en felinos dura de 3 a 7 días y resulta en la expulsión de millones de ooquistes que persisten en el ambiente por muchos meses (12).

Las manifestaciones clínicas asociadas con la infección por *T. gondii* son muy diversas y van desde miocarditis, toxoplasmosis ocular (retinocoroiditis, coroiditis), encefalitis e hidrocefalia hasta enfermedades mentales (13). La enfermedad clínica debido a *T. gondii* no es común porque es predominantemente la etapa del taquizoito de rápida replicación la responsable de la destrucción que resulta en manifestaciones clínicas, y esta etapa generalmente está bien controlada por la respuesta inmune del hospedero. La infección del bradizoito es latente y no genera alguna enfermedad clínica clara. Dos condiciones confieren mayores riesgos de enfermedad clínica: (a) inmunosupresión, la cual típicamente resulta en la conversión del estado bradizoito a taquizoito y (b) una infección primaria durante el embarazo, la cual puede resultar en infección congénita del feto,



donde la falta de un sistema inmune maduro facilita la replicación de taquizoítos (1).

### **2.3 Plasticidad genética de *Toxoplasma gondii***

La plasticidad fenotípica es la habilidad de un genotipo particular de generar más de una forma alternativa en morfología, estado fisiológico, y/o comportamiento en respuesta a las condiciones medioambientales(14). El ambiente no es sólo el agente de selección, en el sentido de ser la arena dónde los distintos fenotipos logran diferentes grados de supervivencia y éxito reproductivo, es también un agente de desarrollo, el cuál influye de forma importante el rango de fenotipos que fueron producidos por un genotipo dado (14).

A pesar de su capacidad para parasitar una gran diversidad de organismos, la diversidad genética de *Toxoplasma* es baja (15) y se clasifica clásicamente en tres linajes denominados I, II, y III, con una tasa de recombinación menor al 5% entre estos, lo que ha llevado a plantear que *T. gondii* tiene una estructura poblacional clonal (16). Además de poseer poca variabilidad genética y prácticamente estar en la mayoría de los vertebrados, el desarrollo en *T. gondii* es enormemente flexible. El que la estructura poblacional sea en su mayoría clonal, no significa necesariamente que no se ejerzan fuerzas o mecanismos de regulación que le permitan resistir condiciones desfavorables al parásito. En *T. gondii*, se han descubierto patrones de empalme alternativo, que aportan a la diversidad proteica, tal como podría suceder en el caso de las adhesinas ya que, a través de un solo gen se producen isoformas y que cumplen diferentes funciones, tales como cambiar los patrones de empalme de exones e intrones, generar proteínas con la misma función o sus antagonistas o que tienen localización celular distintas. Un ejemplo de ellos son las proteínas MyoA/B que presentan varias isoformas o las proteínas asociadas a la interconversión de estadios como ROP18 (17).

## 2.4 Interacción *Toxoplasma*-hospedero

Para llevar a cabo la invasión celular *T. gondii*, debe entrar en contacto y reconocer las células del hospedador; en este caso, existen múltiples interacciones posibles entre receptor- del parásito y su ligando en las células. Inicialmente, se produce una interacción de baja afinidad, mediada por las proteínas de superficie del zoito, de las cuales la mayoría son proteínas denominadas SAGs (“surface antigens”), antígenos de superficie anclados por glucosilfosfatidilinositol (GPI), SRSs (“SAG1-related sequences”) y SUSAs (“SAG-unrelated surface antigens”). Las proteínas SAGs parecen interactuar con glicosaminoglicanos sulfurados como heparina (18). El antígeno de superficie SAG1 ha demostrado ser un ligando crucial para promover la invasión; experimentos de neutralización han revelado que anticuerpos monoclonales anti-SAG1 pueden bloquear parcialmente la invasión de los taquizoitos en cultivos celulares (19). Además, SAG1 soluble puede unirse directamente a la superficie celular. Los cambios conformacionales de SAG1 pueden influir en la adherencia de *Toxoplasma* a las células (20). La invasión de *T. gondii* depende de múltiples factores, entre ellos, otras SAG como SAG2 y SAG3, (21).

Estudios de genética inversa apoyan el papel de SAGs en la adherencia del parásito a la superficie celular. La abundancia y distribución de SAGs en la superficie del parásito permite interacciones laterales de baja afinidad con la superficie celular. Se cree que este hecho permite al parásito la interacción inicial con la célula para la selección del lugar óptimo de invasión. Esta interacción inicial parece ser reversible, permitiendo la separación del parásito si no considera a esa célula en particular ideal para la invasión (22). Por otro lado, SAG1 es el antígeno de superficie más importante; aunque sólo

representa un 3-5% de las proteínas del parásito, la mayoría de anticuerpos son reactivos frente a SAG1 durante la infección (23). SAG1 ha demostrado estimular la inmunidad humoral y celular, protegiendo frente a la toxoplasmosis (24). Esto le hace tener excelentes características de antigenicidad e inmunogenicidad valiosas para diagnóstico e inmunización. Fragmentos de los genes que codifican estas proteínas (de sag1, sag2 y sag4) se han utilizado para el diagnóstico molecular (PCR), especialmente en individuos inmunosuprimidos (23).

Tras el contacto y reconocimiento, una señal desconocida dispara el aumento de calcio en el citosol, que estimula la descarga de los micronemas y la extrusión del conoide; este proceso depende de proteínas-quinasas calcio dependientes (CDPK) (25). Las proteínas de los micronemas MICs ("micronemal proteins") contienen dominios de adhesión, de distintos tipos (tipo trombospondina, factor de crecimiento epidérmico, tipo lectinas, etc.); son proteínas solubles y transmembrana que se liberan y forman complejos sobre la superficie del zoito que se unen a receptores de las células, jugando un papel fundamental en la adhesión y el movimiento siendo MIC1, MIC2 y MIC3 las más importantes (26). Algunas MICs (MIC2) se conectan al sistema actina-miosina vía aldolasa (27). La mayor parte de estas adhesinas son eliminadas por proteasas romboides a medida que la invasión avanza (el zoito se va "desenganchando" y entrando).

En algún momento, un segundo disparo desconocido estimula la exocitosis de las roptrias. Se liberan primero las proteínas del cuello RON ("rhoptry neck proteins"). Las denominadas RON2, RON4, RON5 y RON8 se unen a AMA1 ("apical membrane antigen") (28,29), una proteína que se localiza en los micronemas de los parásitos que se están desarrollando intracelularmente y en la superficie apical de los parásitos extracelulares, justo antes de la invasión; AMA 1 es fosforilada por la quinasa PKA ("cAMP-sensitive kinasa") siendo éste un suceso crítico para la invasión (30). AMA1 y las proteínas RON

citadas forman el ensamblaje móvil, un complejo molecular que enlaza las membranas del zoito y la célula a invadir, y que irá desplazándose sobre la superficie del parásito a medida que éste se impulse hacia el interior. AMA1 es necesaria para organizar el complejo RON durante la invasión; los parásitos deficientes en este antígeno no pueden formar el anillo de ensamblaje (29). El motor de actina-miosina, asociado a la película, generará la fuerza para la invasión (31); si se bloquea, el proceso se interrumpe (32). La proteína RON2 se asocia a AMA1 produciendo una reorganización estructural que permite la formación de una estructura íntima y extensa. Este complejo es lo suficientemente fuerte como para resistir la fuerza de propulsión a través del ensamblaje móvil y ha demostrado ser crucial para la invasión (33). Dos proteínas de las roptrias, Toxofilina y RON8, interaccionan con el citoesqueleto de actina de la célula, facilitando la entrada (28,34). A medida que penetra, el parásito va formando la vacuola parasitófora (VP) (35). Estudios morfológicos y electrofisiológicos han demostrado que los lípidos de la VP provienen de la membrana plasmática del hospedador y no de orgánulos como lisosomas, retículo endoplasmático o aparato de Golgi (36). Además, *Toxoplasma* define activamente la composición proteica de la membrana de la VP (MVP) y durante la entrada elimina las proteínas transmembrana que han intervenido en la formación del ensamblaje móvil y la MVP adquiere un carácter no fusiogénico (13).

## **2.5 Modulación de la respuesta de la célula hospedera**

El inicio de la modulación comienza cuando *Toxoplasma gondii* secreta las proteínas del bulbo de las roptrias, ROPs (“rhoptry bulb proteins”), en pequeñas vesículas que se fusionan con la naciente VP por la cara citosólica. Las proteínas de los gránulos densos, GRAs, se liberarán tras completar la invasión y algunas se insertarán en la MVP. ROPs y GRAs modificarán la VP y la célula que la alberga, convirtiéndola en un hábitat idóneo para el parásito. Para sobrevivir y multiplicarse, *T. gondii* debe adquirir nutrientes del

hospedador. Es auxótrofo para triptófano, arginina, poliaminas, purinas, colesterol, hierro y otros nutrientes esenciales (35). El estado no fusiogénico de la MVP le impide utilizar el sistema endo y exocítico de la célula hospedadora y por ello creará poros en la MVP y una red túbulo-vesicular intravacuolar que permite la difusión bidireccional de pequeñas moléculas (37). De este modo, metabolitos solubles, de 1300-1900 Da, como glucosa, aminoácidos, nucleótidos e iones, acceden a la VP por transporte pasivo. De la misma forma, probablemente, los productos de desecho del parásito pasan al citosol de la célula hospedadora.

El parásito modifica la disposición de algunos orgánulos celulares en su propio beneficio; la mitocondria y el retículo endoplasmático (RE) se sitúan en las proximidades de la VP. ROP2, una proteína anclada a la MVP por un dominio transmembrana, participa en el reclutamiento de la mitocondria (38). Una reducción selectiva de los niveles de mRNA de ROP2 resulta en un menor reclutamiento mitocondrial, una menor adquisición de esteroides y deficiencias en la biogénesis de las roptrias, la invasión, la división del parásito y la virulencia en ratón (39). Por otro lado, se cree que GRA3 y GRA5 están implicadas en el reclutamiento del RE (40).

La infección por *T. gondii* provoca la reorganización de los filamentos intermedios (IFs) y microtúbulos (MTs) de la célula hospedadora, alrededor de la VP (41), estabilizando la arquitectura celular, y permitiendo el movimiento y la relocalización de los orgánulos intracelulares. Los MTs inducen profundas invaginaciones de la MVP hacia el lumen de la vacuola. Los conductos formados transportan vesículas endocíticas conformando una estructura de doble membrana denominada H.O.S.T. ("Host Organelle Sequestering Tubulo-structures") (35,42) a través de la cual algunos nutrientes pueden alcanzar el interior de la VP (43). Varias proteínas GRA se asocian a esta estructura, y una de ellas, GRA7, parece jugar un papel fundamental en el transporte de lípidos (41). El colesterol es crucial para la invasión y la replicación intracelular

de *T. gondii*; así pues el contenido en colesterol de la membrana se ha relacionado con los procesos de invasión (descarga de micronemas y roptrias) (44) y se ha comprobado que el crecimiento del parásito aumenta por adición de colesterol libre o LDL-colesterol al medio extracelular (45). La red intravacuolar de membranas (IVN), generada por las GRAs (46), también se relaciona con la característica disposición en roseta de los parásitos tras su división (47).

En cuanto a las proteínas ROP, citadas anteriormente, algunos miembros de la subfamilia ROP2 (ROPK) serán muy importantes para condicionar la capacidad del parásito para vivir y replicarse, particularmente en células como macrófagos o monocitos, determinando la diferencia de virulencia entre las distintas cepas (48). ROP5, ROP16 y ROP18 tienen un alto nivel de polimorfismo y sus genes se expresan en mayor medida o se regulan de manera específica según la cepa (49).

Para comprender la acción de ROP5, ROP16 y ROP18 es importante entender la influencia de los cambios mediados por *T. gondii* tras la infección y la respuesta del hospedador frente a patógenos intracelulares. Se trata de una situación muy compleja y los análisis de microarreglos han mostrado que intervienen un gran número de genes que son regulados de forma diferente dependiendo de la cepa del parásito y del tipo de células del hospedador (50,51). En el modelo murino, inicialmente, la invasión por *T. gondii* causa un aumento en la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-12 que varían dependiendo de la cepa infectante (52). La IL-12 es producida principalmente por células de la inmunidad innata, como macrófagos y células dendríticas, y está implicada en la inmunidad Th1. La IL-12 estimula la activación de STAT4 que resulta en la diferenciación de las células Th0 a Th1, que junto con las células NK producen grandes cantidades de IFN- $\gamma$  (53). El IFN- $\gamma$  activa a STAT1, culminando la expresión de una serie de proteínas efectoras como las GTPasas p47 que van a ayudar en la destrucción del parásito. Así, el eje

STAT4-STAT1 es esencial para la defensa frente a patógenos intracelulares como *T. gondii*. En una respuesta inmune normal, habría también una reacción antiinflamatoria para compensar la reacción proinflamatoria y prevenir el daño en el hospedador. STAT3 es activada por las células de la respuesta innata a través de la acción de la citoquina antiinflamatoria IL-10, que, en ratones, es secretada principalmente por células T CD4+ (54). Mientras tanto las citoquinas IL-4 e IL-3 de la respuesta Th2 inducen la activación de STAT6 e inhiben la respuesta Th1. Juntos, los STATs son regulados por varias citoquinas y pueden funcionar de formas opuestas para producir una respuesta inmune antiparasitaria equilibrada. Las vías de activación de STATs se regulan mediante un mecanismo de retroalimentación negativo compuesto por reguladores negativos o supresores como los SOCS (“Suppressors of Cytokine Signaling”) (55).

### **2.5.1 Inmuidad frente a *T. gondii***

La respuesta inmune a la infección por *T. gondii* puede variar considerablemente dependiendo de la presentación clínica de la enfermedad. La respuesta inmune local y sistémica también varía entre individuos y parece que depende del componente genético y del estado general del sistema inmune del hospedero (56). Recientes investigaciones muestran que ratones y humanos emplean diferentes rutas de inmunidad innata para controlar la infección por *T. gondii*. En ratones, TLR7 y TLR9 detecta ARN y ADN del parásito, mientras que TLR11 y TLR12 censan proteínas similares a profilina, una proteína de *T. gondii* esencial para la invasión y el reconocimiento del hospedador (57). Este reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) de *T. gondii* por parte de los receptores tipo toll (TLRs), converge en la activación del factor de diferenciación mieloide 88 (MYD88), el cual es necesario para la activación de la IL-12 y subsecuente producción de IFN- $\gamma$  (58). Por lo tanto se cree que la activación de MYD88 dependiente de TLRs en células dendríticas (DC), lleva a la activación de células Th1 de

manera dependiente de IL-12, lo cual se requiere para la supervivencia del hospedero durante la infección (59). Sin embargo, se tiene evidencia de que la producción de IL-12 dependiente de MYD88 puede variar según la cepa infectante de *T. gondii*, ya que cuando se infectan macrófagos de ratón con una cepa RH (tipo I), se observa que la producción de IL-12 se da de manera independiente de MYD88, contrario a lo que ocurre con la cepa ME49 (tipo II) en los mismos macrófagos (40).

El IFN- $\gamma$  es una molécula esencial para la supervivencia del hospedero ante la infección con *T. gondii* (60). Algunos de los mecanismos de protección mediados por el IFN- $\gamma$  incluyen: (a) El bloqueo del crecimiento de *T. gondii* al inducir la degradación del triptófano (61); (b) la inducción de óxido nítrico sintetasa-2 (NOS2) y la liberación de óxido nítrico (NO) por macrófagos (62); (c) la expresión de proteínas IRGs en células mieloides y no mieloides de ratón, que ayudan a la ruptura de la vacuola parasitófora y la degradación de los taquizoítos en el citoplasma de la célula hospedera (63) y (d) la muerte de la célula hospedera mediada por el receptor purinérgico P2X7. Este es un receptor con una alta expresión en la superficie de los macrófagos y su activación se da por el ATP extracelular liberado por procesos como daño celular. La activación de P2X7 se ha mostrado eficiente en la eliminación de microorganismos intracelulares que sobreviven en células de la línea monocito/macrófago como *Mycobacterium*, *Chlamydia* y *Leishmania*, característica que la comparte *T. gondii* (64).

Las células dendríticas activadas y los monocitos inflamatorios producen IL-12 que desencadena en la producción de IFN- $\gamma$  por células asesinas naturales (NK) y luego por linfocitos T. El IFN- $\gamma$  también promueve las células de la inmunidad innata para expresar mediadores pro-inflamatorios. Este medio inflamatorio favorece el desarrollo de linfocitos Th1 que son la base del control



del hospedero a largo plazo contra *T. gondii* (65). La respuesta celular Th1 promueve el desarrollo de células T CD8+ citotóxicas (66) que producen la muerte de células infectadas con *T. gondii*. Las citocinas de tipo Th2 contrarrestan varios de los efectos positivos de las citoquinas de tipo Th1 y por lo tanto presentan efectos adversos en la inmunidad, como ocurre con la IL-10 que regula al IFN- $\gamma$ , de modo que se bloquea la habilidad de esta citocina en la activación de macrófagos (67). Sin embargo, a pesar de que algunos estudios muestran que la ausencia de citoquinas Th2 (IL-4 e IL-13) puede resultar en una elevada inmunopatología y mortalidad, se dice que el balance entre Th1 y Th2 es claramente necesario para una adecuada respuesta inmune (68). En definitiva, estudios en ratón demuestran la importancia de citoquinas como la IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  como mediadores de la resistencia del hospedero al parásito (69).

## **2.6 Principales Factores de virulencia en *T. gondii***

### **2.6.1 ROP16 (GRA15)**

ROP16 es una tirosin-kinasa que se localiza en el núcleo de la célula hospedadora, rápidamente, tras la invasión (50) y su abundancia se relaciona con el número de parásitos, disminuyendo de manera tiempo-dependiente tras la invasión (35). ROP16 imita la acción de las JAKs del hospedador y activa STATs (STAT3 y STAT6) (55). La activación inicial de STAT3 parece ser independiente de esta ROP (55), sin embargo, el mantenimiento de su actividad sí parece requerirla. En cambio, STAT6 necesita de ROP16 (70). Los parásitos de las cepas de tipo I y III, pero no los de la tipo II, provocan una activación sostenida de STATs que conduce a la supresión de citoquinas proinflamatorias, como IL-6 e IL-12, que son la clave para la lucha contra *T. gondii* (69). Los parásitos tipo I carentes de ROP16 no pueden activar ninguna de estas STATs (71).

ROP16, aumenta los niveles de Arginasa-I (Arg-I) vía STAT6 (55). La arginasa hidroliza la L-arginina para producir urea y ornitina y priva a los macrófagos del sustrato preciso para la producción de Oxido nítrico, a través de la enzima óxido nítrico sintetasa, mecanismo esencial para la destrucción de patógenos intracelulares. Esta acción, por lo tanto, favorecerá al parásito. Por otra parte, *Toxoplasma* es auxotrófico respecto a la arginina y su ausencia limitará su capacidad de multiplicación; esto último también podría beneficiarle, al permitirle persistir más tiempo en células – macrófagos y células dendríticas- que juegan un papel muy importante en su diseminación inicial (“Caballo de Troya”). También es posible que la producción de ornitina, fuente de poliaminas, favorezca la proliferación del parásito(72).

La inducción de Arg-I es el resultado de la activación alternativa (M2) de los macrófagos vía STAT3/6. Este proceso conduce a la producción de moléculas antiinflamatorias que inhiben la respuesta Th1 y disminuyen la capacidad de defensa del hospedador (73). Análisis de microarreglos, comparando parásitos de tipo II (deficiente en ROP16) y tipo III, confirman la polarización M2 en los últimos (73).

Por otro lado, la infección de macrófagos por cepas tipo II induce la producción de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$ , IL-6 o IL-12 (51), sugiriendo una activación “clásica” o polarización M1 de los macrófagos. En estos casos también se estimula el ambiente proinflamatorio por señalización NF $\kappa$ B mediada por GRA15 (74); NF $\kappa$ B promueve la transcripción de marcadores de polarización M1 y aumenta la producción de citoquinas proinflamatorias. En este caso, la polarización M2 es activamente bloqueada(51).

ROP16 juega un papel importante no sólo en la polarización de macrófagos in vitro sino también en la inflamación intestinal in vivo (51). Los ratones susceptibles infectados por vía oral con cepas tipo II sufren una grave ileitis que puede ser letal (75). Contrariamente a esto, casi todos los ratones

infectados con cepas tipo II que expresan ROP16 de tipo I o III sobreviven y muestran una inflamación intestinal reducida, con menor infiltración de granulocitos en la lámina propia (51). La ileitis provocada por la toxoplasmosis puede ser tratada eliminando citoquinas efectoras como IFN $\gamma$ , IL-23 e IL-22, sugiriendo el papel de estas citoquinas en la patología (75). Así, ROP16 limita la inflamación intestinal por *T. gondii*.

### **2.6.2 ROP18 (ROP5 y ROP17)**

ROP18 es liberada durante la invasión y se localizará en la MVP y tiene un grado considerable de homología a ROP2 (76) pero es altamente polimórfica (77) y el principal determinante de las diferencias de virulencia observadas entre las distintas cepas (48).

En el modelo murino, ROP18 modifica las respuestas innata y adaptativa. ROP18 es una protein-kinasa capaz de fosforilar GTPasas pequeñas p47, relacionadas con la inmunidad, IRGs “immunity-related GTPases”, inducidas por IFN $\gamma$ , que configuran el mecanismo de defensa intracelular, en macrófagos y células dendríticas, más importante frente a *Toxoplasma* (este sistema no se encuentra en las células humanas). Las IRGs se acumulan en la MVP y la desestabilizan, produciendo su ruptura y finalmente la muerte del parásito (78). ROP18 fosforila las IRGs e impide la ruptura de MVP(79). ROP18 tiene una región rica en arginina y se ha podido comprobar que la disrupción de esta región previene el anclaje de ROP18 a la MVP; esto resulta en la acumulación de IRGs en la MVP y su consecuente destrucción (80), indicando que ROP18 juega un papel esencial en la disfunción de IRGs y que éste depende de su correcta localización.

Las cepas de *T. gondii*, I, II y III, difieren en su susceptibilidad a la muerte mediada por IRGs (63); ROP 18 bloquea este mecanismo en las poblaciones más virulentas (tipo I) mientras que sí es efectivo en la cepas menos virulentas (tipo III). En las de tipo II, ROP18 se expresa, pero las GTPasas de los

macrófagos activados por IFN- $\gamma$  no son fosforiladas (sí se ha comprobado que la ROP18 del tipo II confiere virulencia a las cepas de tipo III). De esto cabe deducir que esta proteína actuará en sinergia con otras moléculas efectoras (81).

Las proteínas ROP5 son pseudocinasas, por secuencia, estructura y función, que actúan como cofactores de ROP18 y son imprescindibles para inhibir el sistema IRG (82). Recientemente se ha comprobado que ROP5 forma complejos con las kinasas ROP18 y ROP17 que fosforilan residuos treonina adyacentes y esenciales de las IRGs (83). Algunos estudios demuestran que ROP18 también inhibe el factor de transcripción ATF6 $\beta$ , localizado en el RE, condicionando la respuesta inmune adaptativa. La degradación de este factor se traduce en una menor producción de IFN- $\gamma$  por células T-CD8 y se ha relacionado con una posible presentación antigénica deficiente por parte de las células dendríticas y los macrófagos (82).

## **2.7. Células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs-h) como modelo de estudio en la interacción *Toxoplasma*-humano.**

### **2.7.1 Modelos experimentales (PBMCs)**

Los modelos utilizados en biología son sistemas experimentales que intentan recrear aspectos de la función o enfermedades del tejido humano con el objetivo de generar inferencias y aproximaciones que contribuyan a la resolución de problemas biológicos, veterinarios o médicos específicos. A pesar de que existen muchos modelos para estudiar los parásitos intracelulares (84), algunos de ellos muestran datos críticos contradictorios, especialmente si se trata de experimentos o ensayos inmunológicos. De manera general, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) han representado una fuente de tejido muy atractiva en estudios

farmacogenómicos, moleculares e inmunológicos, dada la facilidad de recolección de las muestras y su potencial como tejido centinela para monitorear las perturbaciones fisiológicas de la enfermedad. Las PBMCs ya han sido utilizadas para estudiar *Toxoplasma gondii* y otros parásitos apicomplexos, sin embargo este modelo se ha mostrado como un modelo muy sensible a variables como la temperatura, tipo de estímulo (parásitos vivos o antígenos) y el tiempo transcurrido desde la toma la muestra de sangre hasta conseguir los experimentos, así como también el momento preciso de la toma de los datos (84,85). En el desarrollo de vacunas este modelo PBMCs se utiliza con frecuencia, como en el caso de la toxoplasmosis, donde no hay vacuna disponible y la mayoría de los estudios intentan nuevos candidatos terapéuticos y vacunales utilizando péptidos o proteínas recombinantes derivadas del parásito. Con frecuencia, la respuesta inmune a *T. gondii* es muy variable y puede deberse a la necesidad de mejorar y perfeccionar este modelo celular (84).

### **2.7.2 Respuesta inmune en PBMCs estimuladas con *Toxoplasma gondii***

Las PBMCs se han utilizado como modelo para *T. gondii* principalmente en la evaluación de nuevos candidatos a vacunas, nuevos fármacos potenciales y la comprensión de las relaciones entre el sistema inmunológico del huésped y el parásito (84). Estos estudios muestran que los niveles y perfil de citocinas pueden variar según la condición clínica evaluada, el tipo de cepa utilizada y las condiciones de cultivo implementadas, como el tipo de medio de cultivo suplementario, el tiempo de recolección de datos y las variaciones de temperatura durante el almacenamiento, envío y manipulación (86). La respuesta inmune de las PBMCs contra TLA (antígeno lisado total) o péptidos derivados de *T. gondii* se caracteriza predominantemente por los altos niveles de IFN- $\gamma$  en individuos asintomáticos crónicos (87–91), mientras que en individuos con toxoplasmosis ocular (TO) y *Toxoplasma*-seronegativos el nivel

de esta citocina es mucho menor(57,92,93). Las PBMCs también han sido útiles para estudiar la respuesta inmune en personas infectadas por el VIH y mujeres embarazadas con toxoplasmosis. En pacientes con VIH coinfectados con *T. gondii*, se midió la expresión de IFN- $\gamma$  en PBMCs estimulados con antes y después del tratamiento con fármacos antiparasitarios (sulfadiazina, pirimetamina, ácido folínico, trimetoprim-sulfa-metoxazol y corticosteroides), mostrando que la evolución de la infección se correlacionó con la restauración de una respuesta de IFN- $\gamma$  y una disminución de la inflamación (90). Otros estudios mostraron que durante el embarazo hay una expresión disminuida de TNF- $\alpha$  e IL-12 cuando las células son estimuladas con taquizoítos vivos (94). Curiosamente, la adición de la hormona prolactina a las células parece restringir la proliferación del parásito (95). Trabajos similares han demostrado la importancia de la producción de IFN- $\gamma$  en el proceso de transmisión congénita de *T. gondii* a través de la regulación positiva de ICAM-1 (96). Los estudios que estimulan las PBMCs con antígenos completos o parciales de *T. gondii* parecen reflejar aspectos importantes de la respuesta inmunitaria del huésped. Sin embargo, *T. gondii* y otros Apicomplexa secretan proteínas de una manera altamente regulada que están involucradas en los mecanismos de evasión inmunológica por parte del parásito (97). Estos procesos no se reflejan cuando se utilizan antígenos de parásitos, por lo que es recomendable usar parásitos vivos para estimular las PBMCs (84).

Por otro lado, los candidatos a vacunas para *T. gondii* se identifican típicamente como proteínas o péptidos del parásito que provocan una respuesta inmunitaria protectora en ratones. Sin embargo, los buenos candidatos a vacunas en ratones no son necesariamente eficaces en humanos. Las PBMCs tienen el potencial de ser una herramienta extremadamente útil para identificar y caracterizar nuevas vacunas candidatas para *T. gondii*. Las células de individuos con diferentes antecedentes genéticos e inmunológicos se pueden aislar y estimular fácilmente con los

antígenos de interés, para luego medir el perfil de citocinas o la respuesta celular deseada. Sin embargo, hasta donde sabemos, pocos estudios han utilizado esta estrategia (68,88,98). Dichos autores identificaron péptidos novedosos derivados de parásitos que inducen una fuerte producción de IFN- $\gamma$  y en personas que expresan uno de los supertipos de HLA más comunes (HLA-A02, HLA-B07, HLA-A11), lo que las convierte en atractivas para vacunas. Las PBMCs también se han utilizado para evaluar la eficacia de dos fitoecdisteroides ( $\alpha$ -ecdisona y 20-hidroxiecdisona) para controlar la infección por *T. gondii*. Este fármaco es eficaz contra el apicomplexa *Babesia gibsoni*, pero no tiene efecto sobre la proliferación de *T. gondii* ni provoca una respuesta inmunitaria protectora Th1 contra el parásito (99). Por lo tanto, las PBMCs pueden representar un modelo importante y subvalorado para el desarrollo de vacunas y fármacos.

### **2.7.3 Aspectos técnicos a considerar antes de trabajar con PBMCs y *Toxoplasma gondii***

Para obtener datos científicamente válidos, las condiciones asociadas con un experimento y el modelo de estudio deben controlarse de cerca. Las PBMCs son sin duda una de las mejores fuentes para la evaluación de diferencias o cambios asociados con muchas enfermedades o respuesta y terapia farmacológica, además, estas células son relativamente fáciles de obtener por aislamiento de sangre total (100). Un desafío importante en el monitoreo de la calidad de las PBMCs es establecer protocolos que definan los métodos adecuados para el aislamiento, envío y almacenamiento hasta que puedan probarse sin pérdida o cambio de la funcionalidad celular.

Cuando un investigador decide trabajar con PBMCs es muy importante tener en cuenta que este modelo puede verse afectado por muchas variables. Este

modelo se puede utilizar para estudiar *Toxoplasma* en condiciones clínicas y no clínicas, sin embargo, todo el procedimiento desde la extracción de sangre hasta el momento de la experimentación debe estar altamente estandarizado. Las PBMCs son células vivas percederas, algunas de las cuales comienzan a morir inmediatamente después del aislamiento de la sangre completa. Se han realizado comparaciones de diferentes técnicas de aislamiento pero no se han encontrado diferencias con respecto a los métodos generalmente utilizados, por ejemplo: centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Paque y tubo de preparación celular BD Vacutainer (CPT) (101). Por el contrario, algo que se ha presentado como un evento importante una vez realizado el aislamiento de PBMCs son los eventos apoptóticos tempranos, ya que tanto experimentos *in vitro* como *ex vivo* muestran que las células están muy afectadas, por lo que la apoptosis es un evento muy importante para determinar (102). Se han utilizado diferentes métodos para medir la apoptosis, tal es el caso del método YO-PRO-1/7-AAD, que se ha propuesto como una técnica alternativa buena y de bajo costo para la detección sensible de la apoptosis temprana en PBMCs con más del 80% de viabilidad (85).

No siempre es posible trabajar con PBMCs recién aisladas, por lo que las células generalmente se congelan y descongelan para su procesamiento en un momento posterior; a pesar de que se ha sugerido una descongelación por lotes de diferentes muestras para tener un parametro de comparabilidad directa en los ensayos y reducir la variabilidad entre estos (103), son pocos los estudios que han utilizado PBMCs y que puedan ser comparables entre ellos. Posiblemente lo anterior se deba a fenomenos como la apoptosis y la necrosis que han sido bien documentados durante la criopreservación (104–108). Recientemente, un estudio evaluó los efectos de la temperatura de almacenamiento en las PBMCs y demostró que no solo la viabilidad y recuperación de las PBMCs se ven afectadas durante la criopreservación, sino también su patrón de expresión génica, en comparación con las PBMCs recién



aisladas (107). La dificultad en la comparabilidad entre los estudios de expresión genica y que utilizan PBMCs está relacionado también con el hecho de que en una célula infectada con *Toxoplasma* cada hora representa un perfil genético de expresión diferencial específico (109,110). En consecuencia se hace necesario estandarizar estudios de expresión de genes, donde la planificación, el diseño experimental y la recopilación de los datos se haga cuidadosamente (111) y de esta manera poder tener en algún momento datos y estudios comparables.

Uno de los principales problemas con el modelo de las PBMCs y *Toxoplasma gondii* es que la mayoría de los estudios no son comparables entre ellos ya que no tienen en cuenta el aspecto del tiempo para obtener datos (84). La mayoría de los estudios muestran que el tiempo de recolección de datos de las células después de un estímulo es variable, por ejemplo, no hay ningún argumento que afirme que un sobrenadante para la medición de citocinas debe realizarse en un período de tiempo exacto. Una gran parte de los estudios informan diferencias en el tiempo de cultivo de PBMCs que varía de 48 horas a 7 días, o incluso recolección de sobrenadante para medir IFN- $\gamma$  después de 12, 24 o 48 horas (84). En este sentido, el tiempo de cultivo y/o recolección de datos debe explicarse de manera detallada en la metodología.

## **2.8 PBMCs / Ómicas y *Toxoplasma***

Las técnicas ómicas representan una herramienta poderosa en la biología moderna que permite mediciones de alto rendimiento de muchos genes, proteínas y metabolitos en diferentes muestras. Un número limitado de estudios con *Toxoplasma* han empleado perfiles transcripcionales globales utilizando células mononucleares de sangre periférica, encontrando tan solo un par con PBMCs de cerdos y uno con PBMCs humanas (112) (110). Algunos otros estudios con *Toxoplasma* han utilizado ómicas pero en neuronas corticales, astrocitos, células de músculo esquelético y fibroblastos y otras

células derivadas, la mayoría de ellas en el modelo murino (109,110,113,114). Todos estos estudios muestran que la expresión génica y, en consecuencia, los niveles de proteínas y metabolitos pueden sufrir cambios en diferentes condiciones fisiológicas. Otros estudios sugieren que los patrones de expresión génica en PBMCs dependen en gran medida de variaciones temporales e interindividuales y también muestran una fuerte evidencia de que el perfil de expresión génica de estas células es muy sensible a largos períodos de incubación (115), además de estar afectado dramáticamente por criopreservación (107). Hoy en día, no hay ningún informe en la literatura que intente analizar el perfil transcripcional global utilizando PBMCs de humanos estimuladas con *Toxoplasma gondii*. Por lo tanto, técnicas ómicas como RNAseq dual (116) en PBMCs de individuos sanos y que padecen toxoplasmosis podrían ser una excelente oportunidad para obtener datos importantes y relevantes para comprender esta enfermedad infecciosa.

Dada la cantidad de estudios que muestran las diferencias metodológicas antes mencionadas, considerar los ensayos *ex vivo* como un modelo adecuado para el análisis de lo que está sucediendo durante la infección por *Toxoplasma* en humanos surge como una buena alternativa basada en estas principales razones: i) un experimento *ex vivo* debe por lo general, realizarse en un período de tiempo no superior a 24 horas con el fin de minimizar el efecto del estrés generado en las células; ii) las PBMCs tienen características muy interesantes porque son células primarias, no inmortalizadas y con antecedentes genéticos de pacientes reales, y iii) los experimentos *ex vivo* tienen la ventaja de que pueden analizarse muy pronto después del muestreo y esto es especialmente crítico en estudios de expresión genética donde el análisis de datos es un factor sensible al tiempo.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

*Toxoplasma gondii* es un parásito intracelular obligado que invade y se replica en casi todas las células nucleadas de la gran mayoría de vertebrados. *T. gondii* es el segundo patógeno más importante de transmisión alimentaria generando importantes pérdidas económicas y un detrimento en la calidad de vida de las personas infectadas, especialmente en personas inmunocomprometidas. El éxito atribuido a este parásito se debe a sus sofisticados mecanismos de supervivencia que este establece en el interior de la célula que invade. *Toxoplasma* tiene la capacidad de modular y controlar la respuesta inmune del hospedero a través de la secreción de proteínas que intervienen en las vías de señalización que inician la transcripción de los genes encargados de la respuesta inflamatoria anti-*Toxoplasma* en la célula hospedera. Lo que mejor se conoce acerca de la modulación de ARN mensajeros de genes del hospedador por toxoplasma han sido realizados en el modelo ratón y el modelo porcino, siendo muy escasa la información proveniente de modelos mucho más cercanos al ser humano, de hecho, la mayoría de esta información en humanos se ha obtenido por modelos celulares en líneas humanas de laboratorios, como las células endoteliales, células dendríticas o las células HFF (*human foreskin fibroblast*) derivadas de fibroblastos de prepucio humano y siendo mucho más limitada la información de estudios en células humanas provenientes de individuos que padecen la enfermedad. En la ciencia actualmente existe el reto de replantear, re-evaluar, y ajustar modelos de estudio, con el fin de permitir una mejor comprensión de los fenómenos, en el caso de la toxoplasmosis humana, recientes investigaciones muestran que ratones y humanos emplean diferentes rutas de inmunidad innata para controlar la infección por *T. gondii*, por lo que re-evaluar un modelo como los PBMCs humanos permitiría ampliar nuestro conocimiento de la interacción *Toxoplasma*-humano y un análisis dual nos permitiría

conocer los genes y rutas de comunicación celular que están siendo moduladas por el parásito.

#### **4. OBJETIVO**

Analizar y comparar la interacción de *Toxoplasma gondii* RH con PBMCs de individuos con toxoplasmosis crónica (IgG+) y PBMCs de individuos negativos (IgG-) para toxoplasmosis en un modelo celular *ex-vivo*.

##### **4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

Establecer un modelo de infección *ex-vivo* en PBMCs humanos infectados con *T. gondii* RH-GFP.

Analizar la expresión diferencial de genes de la interacción de PBMCs humanos infectados por *Toxoplasma gondii* en un modelo de infección *ex-vivo*.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Población del estudio y declaración de ética

Con el fin de disminuir la varianza biológica todos los sujetos de investigación humanos fueron hombres mayores de 18 años hasta un máximo de 40 años de edad. El estudio no involucró a poblaciones vulnerables y minoritarias (por ejemplo, fetos, mujeres embarazadas, niños, presos, entre otros). La muestra fue a conveniencia basado en las limitaciones de dinero y en los altos costos de la técnica de RNAseq. Además, la investigación no incluyó más que un riesgo mínimo según resolución 8430, riesgo relacionado solo al momento de la toma de muestras de sangre. El estudio incluyó a personas nuevas y de seguimiento que consultaron al Centro de Salud de la Universidad del Quindío (Armenia, Colombia), donde contamos con normativa de bioseguridad y personal capacitado para extraer las muestras de sangre con el fin de reducir el riesgo. Todos los individuos IgG positivos para toxoplasmosis fueron diagnosticados previamente por un médico experto en toxoplasmosis en el Centro de Salud de la Universidad del Quindío, los individuos IgG negativos fueron confirmados por eliza comercial. Posteriormente, se extrajeron muestras de sangre previa firma del consentimiento informado. Este estudio, con sus respectivos consentimientos informados, fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad del Quindío, acta 08 de mayo 2016 (anexo 32). Todas las pruebas diagnósticas se realizaron en el laboratorio clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Quindío.

### 5.2 Cultivo de parásitos

La cepa de *T. gondii* diseñada para expresar proteína verde fluorescente (GFP) fue un donada por el doctor J. Saeij (MIT, Cambridge, MS). Se cultivaron fibroblastos de prepucio humano (HFF) (ATCC ATCC® SCRC-1041™) en

medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco, Grand Island, NY, EE. UU.) Suplementado con FBS inactivado por calor al 10% (Gibco), 2 mM L-glutamina, 100 U / mL de penicilina y 10 g / mL de estreptomina. En este estudio se utilizó la cepa *T. gondii* RH-GFP (tipo I) para simular las cepas encontradas en Sudamérica que contienen alelos tipo I / III o atípicos y que se relacionan significativamente con una mayor severidad en la toxoplasmosis humana (117). Los parásitos se mantuvieron mediante pases en serie en monocapas confluentes de estas células HFF en condiciones de cultivo estándar (67). Todos los parásitos y células HFF se mantuvieron a 37 ° C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Para la purificación de *T. gondii*, los parásitos y las células HFF se recolectaron después de que los parásitos egresaron. La mezcla se lavó dos veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y el sedimento se resuspendió en PBS frío. Para reducir la contaminación de los restos de células HFF, las muestras recolectadas se pasaron a través de una aguja de calibre 22 para romper las células huésped. Los parásitos obtenidos se lavaron dos veces con PBS frío y se sedimentaron a 350 g durante 10 min. Los parásitos purificados se resuspendieron en PBS frío, se contaron y se utilizaron para los siguientes experimentos de PBMCs.

### **5.3 Metodología para establecer un protocolo estandarizado en condiciones de cultivo *ex vivo* utilizando PBMCs humanas (objetivo 1)**

#### **5.3.1 Aislamiento, evaluación de viabilidad y análisis de subpoblaciones de los PBMCs humanos**

Se extrajeron 20 ml de sangre humana de 5 individuos (3 con toxoplasmosis crónica asintomática (IgG +) y 2 seronegativos para anticuerpos IgG e IgM anti-*Toxoplasma*, todos hombres entre 18y 40 años) mediante venopunción en tres momentos diferentes. Para todos los individuos, inicialmente se aplicó una encuesta para excluir a personas con otras enfermedades infecciosas crónicas

y manifestaciones clínicas similares a la toxoplasmosis. Las PBMCs se aislaron de la sangre mediante centrifugación en gradiente de densidad (1314 g, 30 min) usando Histopaque 1077 g / ml (Sigma-Aldrich Products, Darmstadt, Alemania). Para evaluar la viabilidad de las PBMCs en condiciones de cultivo no suplementados (sin suplementos / sin antibióticos), las PBMCs aisladas se dispensaron en placas de 24 pocillos (5x10<sup>5</sup> células por pocillo) en dos condiciones, la primera con 0,5 mL de medio RPMI 1640 (Gibco ) y el segundo con 0,5 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,2 M para resuspender las células. Ambas condiciones se incubaron a 37 ° C, 5% de CO<sub>2</sub> durante cinco puntos de tiempo diferentes (de 1 a 5 días). Para analizar la viabilidad de las PBMCs, las células se midieron con un ensayo de exclusión de colorante azul tripán (0,4%) y el recuento celular se realizó utilizando una cámara de Neubauer. Las mismas muestras se utilizaron para establecer las subpoblaciones de PBMCs utilizando un Hemocitómetro automatizado (ABX, Micros ES Horiba). Este experimento se realizó por triplicado y se repitió tres veces de forma independiente con los 5 individuos.

### **5.3.2 Ensayo de adhesión de los PBMCs humanos en condiciones *ex vivo***

Debido a que las PBMCs no son células que se adhieren naturalmente, evaluamos diferentes tiempos para encontrar una "adhesión mínima" (se refiere a al menos el 80% de las PBMCs totales sembradas en la placa) necesarias para realizar el ensayo de infección con *T. gondii* en condiciones *ex vivo* (como máximo 24 horas después de obtener la muestra, sin suplementos de vitaminas o aminoácidos y sin antibióticos). Se agregaron un total de 500.000 PBMCs obtenidos de los mismos 5 individuos descritos anteriormente por pocillo en una placa de 24 pocillos y se diluyeron en medio RPMI (sin suplementos). Se evaluaron cuatro puntos de tiempo diferentes (2 h, 6 h, 12 h y 24 h) y todas las muestras se incubaron a 37 ° C, 5% CO<sub>2</sub>. Para establecer el porcentaje de células adherentes, se realizaron tres lavados



suavemente con PBS y se contó el número de células suspendidas en cada lavado y se restó del total de células inicialmente sembradas, se realizó el recuento celular con cámara Neubauer.

#### **5.3.4 Establecimiento de la Multiplicidad (MOI) de infección con *T. gondii* sobre PBMCs humanos y evaluación de tiempos post-infección**

Se añadieron 500.000 células PBMCs por pocillo en una placa de cultivo de 24 pocillos, 2 horas después, las células se lavaron suavemente dos veces usando PBS. Posteriormente, la infección se realizó con *T. gondii*-GFP-RH con diferente multiplicidad de infección (MOI) 1: 1, 1: 5 y 1: 10). La infección se dejó durante 1, 6 y 24 horas después de la infección y se incubó a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Una vez cumplidas las horas de infección, el cultivo se lavó suavemente 3 veces con RPMI sin suero bovino fetal para eliminar los parásitos extracelulares. Finalmente, las células se tiñeron con Hoechst y se observaron mediante un microscopio de fluorescencia utilizando un zoom óptico de 20X y contando el número de parásitos / vacuolas por campo, se tomaron 4 fotografías por campo. Las imágenes se analizaron con el software imageJ (118), donde se estableció la fluorescencia relativa mediante el promedio de los cuatro recuentos. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Las células HFF se utilizaron como referencia para comparar la infección.

#### **5.3.5 Estimulación de PBMCs en cultivo *ex vivo* en condiciones estandarizadas**

La infección de PBMCs se realizó con *Toxoplasma gondii* RH-GFP usando un MOI de 1: 5 (de acuerdo con nuestros resultados anteriores en MOI y tiempos posteriores a los experimentos de infección). Se cultivaron PBMCs humanas usando  $1 \times 10^5$  células por pocillo en placas de 24 pocillos. Las PBMCs se incubaron a 37 ° C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 2 horas para

unirlas a la placa. Después de eso, lavamos dos veces con PBS 1X para eliminar las células adherentes. Luego, se agregaron parásitos frescos de *T. gondii* GFP-RH al cultivo celular durante 1 hora, se incubaron en las mismas condiciones y se lavaron nuevamente para eliminar tantos parásitos extracelulares como fuera posible. Las PBMCs sin estímulo parasitario se incluyeron como control negativo. Las PBMCs estimuladas se recolectaron a las 6 y 24 horas post-infección, realizando una centrifugación a 2.000 g durante 5 minutos a 4°C. Finalmente, las células se tiñeron con Hoechst y se observaron mediante un microscopio de fluorescencia con zoom óptico de 20X y se contó el número de parásitos / vacuolas por campo, se tomaron 4 fotografías por campo. Las imágenes fueron analizadas por el software image J, donde establecimos la fluorescencia relativa a través del promedio de los cuatro conteos y normalizamos a través del fondo sustraído usando el promedio de la fluorescencia relativa de 4 fotografías del control negativo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **5.4 Ensayo inmunomodulador**

Para observar si las PBMCs humanas, que son células especializadas en inmunidad, pueden modular la respuesta de otras células no inmunes, realizamos un ensayo para evaluar el efecto inmunomodulador de las PBMCs sobre un cultivo de células HFF infectadas con *T. gondii*. Para ello se utilizaron PBMCs de un individuo asintomático crónico y de un individuo negativo. Se añadieron 500.000 células HFF por pocillo en una placa de cultivo de 24 pocillos, una vez que se estableció la monocapa (24 h aproximadamente), las células se lavaron tres veces usando PBS. Posteriormente, la infección se realizó con *T. gondii*-GFP con diferentes MOI (MOI: 1: 1, 1: 5 y 1:10). La infección se dejó durante 1 hora y se incubó a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. El cultivo celular se lavó suavemente 3 veces con medio RPMI sin suero bovino fetal para eliminar tantos parásitos extracelulares como fuera posible. Después de

eso, las PBMCs de los dos individuos se agregaron inmediatamente a las células infectadas con HFF. 24 horas después de la infección, se lavaron las células HFF para eliminar tantos parásitos extracelulares como fuera posible. Las células HFF se tiñeron con Hoechst y se observaron en un microscopio de fluorescencia con zoom óptico de 20X. Se contó el número de parásitos / vacuolas por campo, se tomaron un mínimo de 4 fotografías por campo. Las imágenes se analizaron con el software Image J, donde se estableció la fluorescencia relativa mediante el promedio de los cuatro recuentos. Este ensayo se realizó por triplicado.

### **5.5 Aislamiento de ARN total y análisis de RT-PCR**

Para evaluar la presencia de *T. gondii* en el modelo *ex vivo* de infección con PBMCs humanas, se centrifugaron las PBMCs infectadas en 2.2.3 y posteriormente se realizó la extracción de ARN, esta se llevó a cabo utilizando el minikit Purelink Ambion RNA (Ref: 12183025), siguiendo las instrucciones del fabricante. Tratamos las muestras con una digestión de 15 minutos a temperatura ambiente que elimina el ADN contaminante usando DNasa I (Sigma-Aldrich Products). La calidad y cantidad del ARN purificado se determinaron midiendo la absorbancia a 260 nm / 280 nm usando un espectrofotómetro de microplacas Epoch <sup>TM</sup> (BioTek). La integridad del ARN se verificó adicionalmente mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Las amplificaciones de las transcripciones del gen GAPDH de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa humana se hicieron utilizando el cebador directo 5'GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC-3' y el cebador inverso 5'-CAGAGTTAAAAGCAGC CCTGGT-3' (119) y la amplificación de la secuencia repetida de *Toxoplasma* RE con el cebador directo 5'AGGGACAGAAGTCGAAGGGG3' y el cebador inverso 5' GCAGCCAAGCCGGAAACATC 3' (120) la cuales se llevaron a cabo con el sistema de RT-PCR en un solo paso Super Script <sup>TM</sup> III con el kit Platinum<sup>®</sup>Taq

High Fidelity de INVITROGEN. Los productos de RT-PCR se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con tinción en gel de ácido nucleico SYBR® Green I.

## **5.6. Análisis transcriptómico de PBMCs infectados con *T. gondii* (objetivo2)**

Para el análisis de ARN-seq, se aislaron PBMCs (Asym n=3; Neg n=3) siguiendo las recomendaciones de Acosta & Hernandez (84) en el manejo de PBMCs para análisis transcriptómico (**Anexo 1**). Se cultivaron  $1 \times 10^6$  células en placas de 24 pozos, y posteriormente fueron infectados con las cepas RH o RH *rop16* con un MOI 1:3, durante 0, 1 y 6 horas post-infección (**hpi**). El tiempo de infección fue determinado por trabajos previos de ARN-seq en *T. gondii* (121). Cada condición se realizó por duplicado y el tiempo cero se tomó como células sin infección. El ARN total fue extraído de las células utilizando el estuche PureLink ARN Mini (Ambion), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizó la eliminación del ADN genómico utilizando ADNasa I (Invitrogen) por 45 min a temperatura ambiente y se congelaron las muestras a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su envío a la empresa NOVOGENE ([https:// en.novogene.com/next-generation-sequencing-services/](https://en.novogene.com/next-generation-sequencing-services/)), quien prestó el servicio de secuenciación de ARN. Brevemente, a partir de ARN mensajero se realizaron bibliotecas de secuenciación de ADNc y se sintetizaron utilizando el kit de preparación de ARN TruSeq (Illumina, San Diego, EE. UU.). Se realizó RNA-seq (150 pb; final pareado; mínimo 30 millones de lecturas / muestra) utilizando Illumina HiSeq2000 siguiendo los parámetros estándar de control de calidad (anexos 33-37).

Las lecturas crudas se mapearon utilizando los genomas de referencia de *H. sapiens* (hg38) y *T. gondii* (ToxoDB-49\_TgondiiGT1) permitiendo 3 *mismatches* con TopHat versión 2.1.0 (122). Los perfiles normalizados de transcripción se estimaron basados en el resultado del mapeo utilizado

Cufflinks (123). Para cada transcrito, las lecturas crudas fueron normalizadas a el número de fragmentos por kilobase por millón de fragmentos mapeados (FPKMs). Los genes diferencialmente expresados fueron identificados por medio del programa Mathematica (Wolfram) (<https://www.wolfram.com/mathematica/>), usando *2-fold change* para humano y el parásito y un límite de falso descubrimiento del 5% (FDR).

### 5.7. Análisis Funcional (Enriquecimiento de GO)

Para el análisis funcional de genes se utilizaron diversas plataformas: **ToxoDB** (<https://toxodb.org/toxo/app/>) (124,125), **Gene Ontology GO** (<http://geneontology.org/>), también se utilizó la herramienta web **Enrichr** (<https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr>) (126) y la herramienta **REACTOME** (<https://reactome.org>) (127). En cuanto a plataformas integradoras se utilizó **g :profiler** (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>) para establecer categorías funcionales (128). Con ayuda de este mismo servidor (g: profiler) se evaluó a través de TRANSFAC (<https://genexplain.com/transfac/> : una base datos de factores de transcripción eucariotas y sus posibles sitios de unión a ADN) los posibles set de datos relacionados con Dominios de unión a factores de transcripción En todos los casos se tuvieron en cuenta los términos GO que estaban significativamente enriquecidos cuando el valor de p era inferior a 0,05 en cada plataforma. El enriquecimiento GO y las rutas fueron visualizadas con múltiples gráficos propios de cada plataforma. Se realizó un análisis de interacción proteína- proteína de los DEGs utilizando la base de datos en línea: Herramienta de búsqueda para la recuperación de genes interactuantes (**STRING**, versión 11.0) (<https://string-db.org/>) (129) y se eliminaron los nodos proteicos que no tuvieron interacción con otras proteínas. Para la determinación de las “proteínas hipotéticas” en *T. gondii* se utilizó el filtro de “péptido señal” para cada uno de los sets de datos en la plataforma ToxoDB.

## **5.8 Análisis estadístico**

En los resultados del modelo de infección se calcularon promedios y desviaciones estándar para datos que presentaron distribución normal (Prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov-  $p > 0.05$ ) y medianas y rangos para los datos que no presentaron dicha distribución.

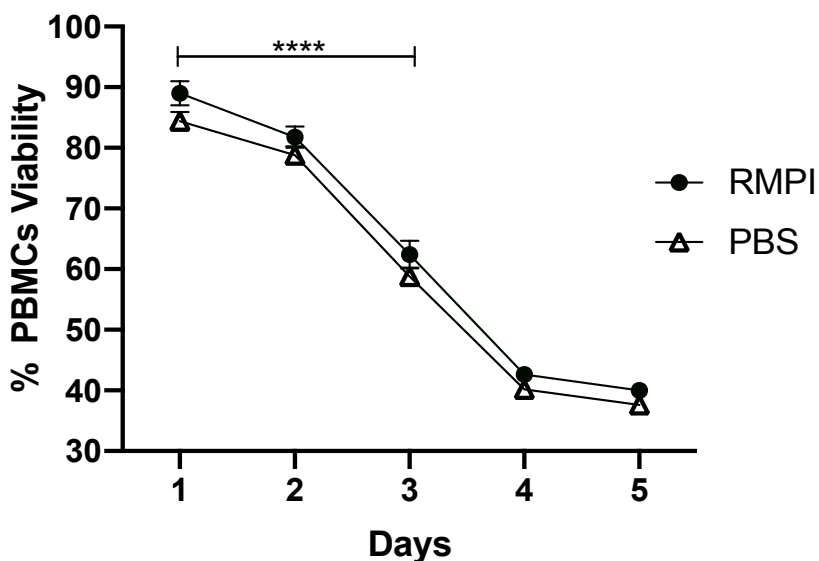
Los niveles de infección de PBMCs humanos y MOI del modelo MeExSs se compararon mediante pruebas paramétricas (ANOVA de una y dos vías) para los datos con distribución normal y mediante pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis) para los que no presentaron esta distribución. Así mismo se realizó una comparación múltiple de Dunn para identificar los grupos donde se encontraban las diferencias. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos para un valor de  $p$  inferior a 0,05. Todos los cálculos se realizaron utilizando el software Graphpad Prism versión 6.0 (San Diego, CA, EE. UU.).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Viabilidad de PBMCs humanas y análisis de subpoblaciones en condiciones de cultivo *ex vivo* sin suplementos (MExSs)

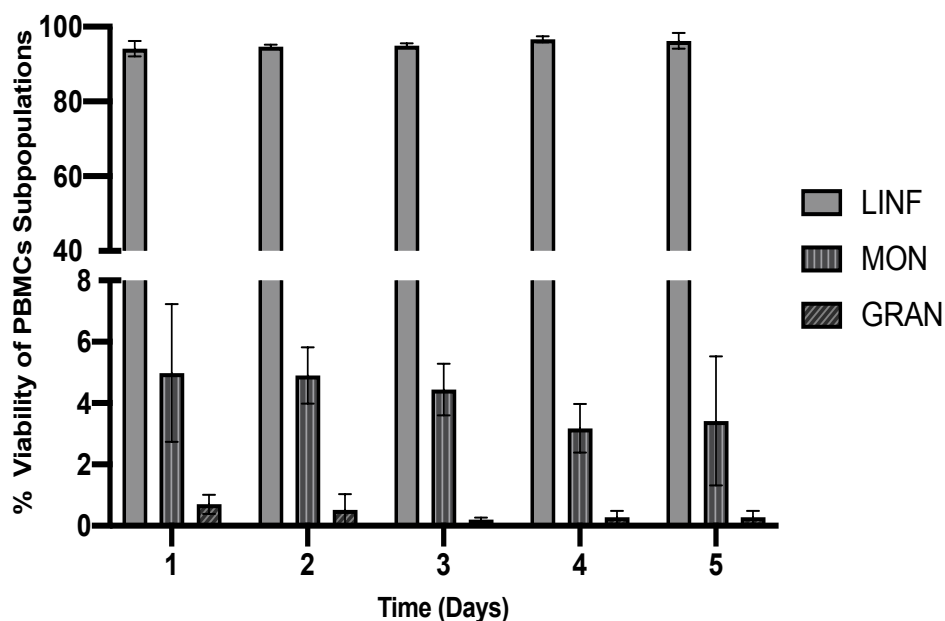
Se midió la viabilidad de las PBMCs en condiciones de cultivo *ex vivo* (sin suplementos / sin antibióticos) cada 24 horas en cinco puntos de tiempo hasta 5 días. En las primeras 24 horas, la viabilidad de las PBMCs humanas fue superior al 80%. Hubo efectos significativos sobre la viabilidad a las 72 horas, tanto en medio de cultivo PBS como RPMI, alcanzando una viabilidad del 60% o menos desde el día 3 al día 5 (Figura 1). A pesar del hecho de que la viabilidad de las PBMCs en condiciones de cultivo se ve dramáticamente afectada después de 72 horas, las proporciones de las subpoblaciones en las PBMCs no cambiaron significativamente con el tiempo (Figura 2). Después de 5 días de seguimiento de PBMCs humanas, los linfocitos presentaron el mayor número de células, superando el 85% en todos los recuentos y seguidos por los monocitos, que presentaron valores ligeramente variables (Figura 2).

#### Viabilidad de los PBMCs humanos en condiciones de cultivo *ex vivo*



**Figura 1.** Porcentaje de viabilidad de PBMCs humanas en condiciones de cultivo *ex vivo* (sin antibióticos ni suplementos) durante 5 días. La línea con círculos indica PBMCs que se cultivaron con medio RPMI y la línea con triángulos indican PBMCs que se cultivaron en tampón PBS. Estos datos son representativos de 5 experimentos realizados utilizando cinco muestras de PBMCs. Los datos se presentan con media y SEM. Se realizó una prueba ANOVA bidireccional para comparar los datos. Se encontraron diferencias estadísticas significativas desde el tercer día de cultivo. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

### Viabilidad de las subpoblaciones de PBMCs humanos en el tiempo en condiciones *ex vivo*



**Figura 2.** Porcentaje de subpoblaciones de PBMCs humanas en condiciones de cultivo (sin antibióticos ni suplementos, solo PBS-1X) durante 5 días. LIN: Linfocitos, MON: monocitos, GRAN: granulocitos. Se realizó una prueba ANOVA bidireccional para comparar los datos. Los datos se presentan con media y SEM. No hubo diferencias estadísticas significativas entre el

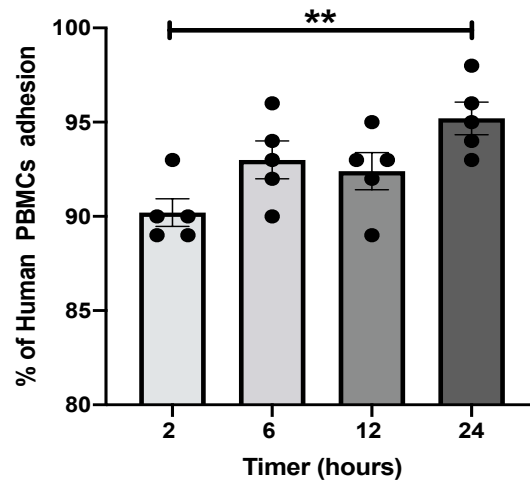


porcentaje de viabilidad de las subpoblaciones de PBMCs a lo largo del tiempo  $p = 0,9607$ .

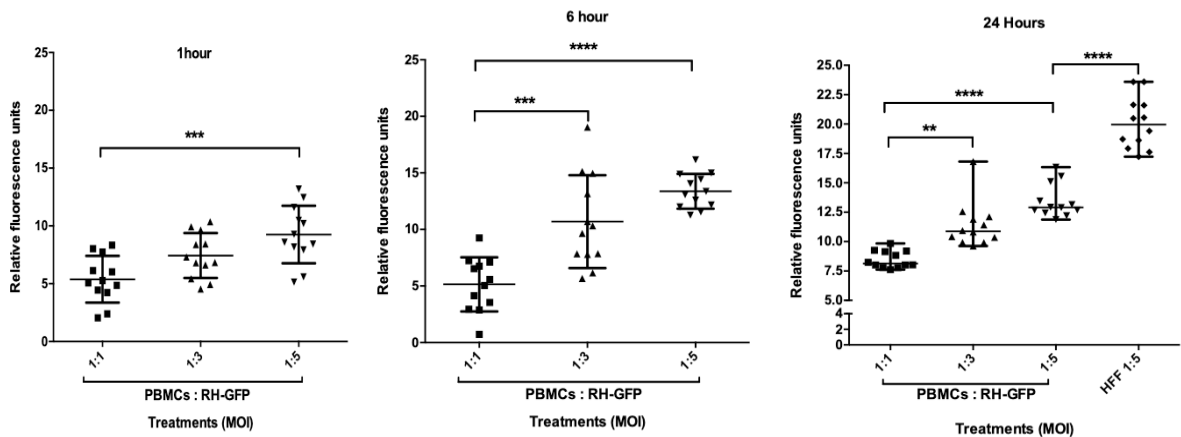
## **6.2. Ensayo de adhesión y multiplicidad de infecciones de los PBMCs humanos en condiciones *ex vivo***

Evaluamos el impacto del tiempo necesario para conseguir una adherencia mínima de las PBMCs a la placa con el fin de desarrollar un modelo *ex vivo*. Los resultados mostraron que 2 horas es el tiempo mínimo que requieren las PBMCs humanas para conseguir una adherencia a la placa superior al 90% y al aumentar el tiempo aumenta ligeramente la adherencia de las PBMCs a la placa (Figura 3). Por otro lado, la infección por *T. gondii* en PBMCs humanas mostró que está depende del MOI y que aumenta con el tiempo (Figura 4). Sin embargo, para el MOI 1:1, no se observaron diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo (incluye el valor  $p$ ). Estos resultados indicaron que para un MOI 1:1 no es suficiente para llevar a cabo una infección / estimulación efectiva en PBMCs (Figura 4), mientras que con MOI 1:5 fueron las dosis más eficientes de infección, por lo que se utilizó para los siguientes experimentos. Los resultados de la RT-PCR mostraron que las PBMCs humanas pueden infectarse después de una hora de infección con *T. gondii* (Figura 6).

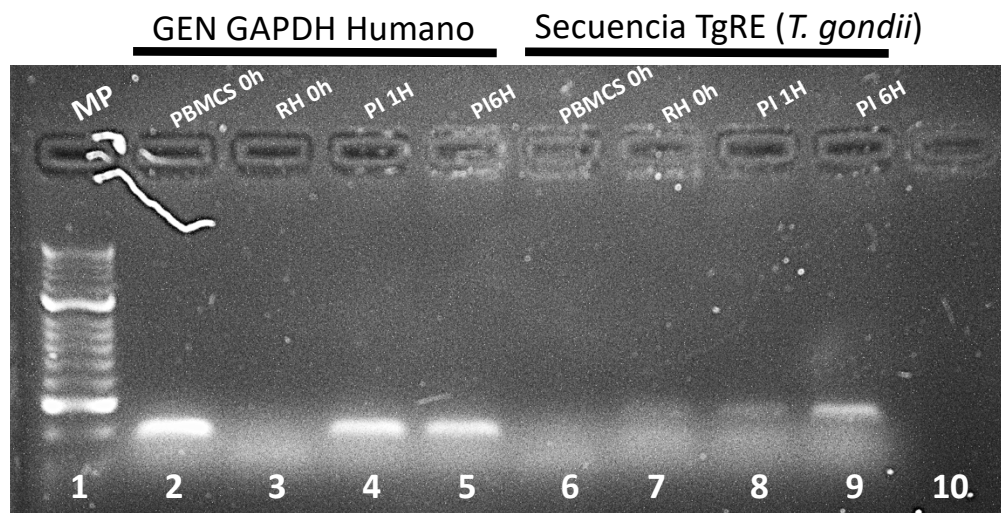
### **Adhesión de los PBMCs a la placa de cultivo en condiciones *ex vivo***



**Figura 3.** Porcentaje de adhesión de PBMCs humanas a la placa en condiciones de cultivo *ex vivo* a lo largo del tiempo (sin antibióticos ni suplementos, solo PBS 1X). Los datos se presentan con media y SEM. Se realizó una prueba ANOVA de una vía para comparar los datos a lo largo del tiempo. No hubo diferencias estadísticas significativas entre el porcentaje de adhesión de PBMCs humanas comparando 2, 6 y 12 horas ( $p > 0.05$ ). Solo se encontraron diferencias significativas en el % de adhesión de PBMCs entre 2 y 24 horas de cultivo celular ( $p = 0,005$ ). \*\*  $p < 0,01$ .



**Figura 4.** Comparación de infección de PBMCs humanas en el tiempo con *T. gondii* RH-GFP. Evaluamos diferentes MOI de infección (1: 1, 1:3 y 1:5) en 3 tiempos diferentes (1, 6, 24 hpi). HFF: control de células de fibroblastos humanos (con una MOI: 1:5 a 24 hpi). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los datos representan la mediana y el error estándar \*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*\*\*  $p < 0,00001$ . Se realizaron Kruskal-Wallis y el Test de Dunn para comparar los grupos.



**Figura 5.** RT-PCR- Visualización de la expresión del gen GAPDH humano y el gen RE de *T. gondii*. P1: marcador de peso molecular, P2-P5: detección del gen GAPDH: P6-P9: detección de la secuencia repetida TgRE, P10: Control negativo.

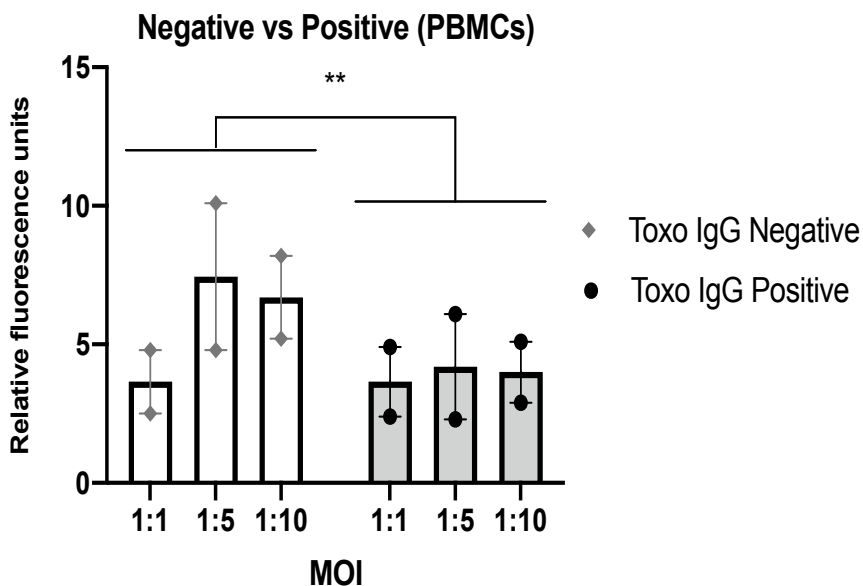
### 6.3. Estandarización de las condiciones de cultivo *ex vivo* de las PBMCs humanas

La muestra de sangre debe procesarse inmediatamente después de la recolección para evitar la criopreservación (variabilidad de los datos) y poder considerarse como un ensayo *ex vivo*. Se identificaron condiciones específicas

para desarrollar una infección ex vivo de PBMCs con *T. gondii*. La viabilidad de las PBMCs debe ser superior al 90%, que se mantiene durante las primeras 24 horas de incubación. Una hora es tiempo suficiente para una infección en PBMCs humanas (Figura 4) y dos horas es el tiempo mínimo de incubación para garantizar la adherencia antes de realizar cualquier ensayo de infección por *T. gondii*. El MOI mínimo necesario es de 1 célula :3 parásitos para garantizar una infección eficaz en PBMCs humanas con *T. gondii* RH-GFP (Figura 4). La muestra no debe crio-preservarse y no deben agregarse suplementos como SFB. Todos los protocolos, incluido el aislamiento y la estimulación de PBMCs, deben realizarse el mismo día.

#### **6.4. Ensayo exploratorio inmunomodulador**

Estábamos interesados en explorar si las células HFF infectadas con *T. gondii* podrían alterarse por el posible efecto inmunomodulador de las PBMCs humanas, según las características (Toxo IgG positivo frente a Toxo IgG negativo) de estas células. Nuestros datos sugieren un posible efecto de las PBMCs humanas sobre la infección en HFF debido a efectos de las PBMCs, mostrando diferencias estadísticamente significativas entre el efecto inmunomodulador de las PBMCs de individuos seronegativos en comparación con individuos seropositivos sobre las células HFF infectadas (valor  $p < 0,008$ ), Figura 6.



**Figura 6.** Comparación de co-cultivos de HFFs infectadas con *T. gondii* y posterior agregación de PBMCs IgG positivos e IgG negativos. Los diferentes MOI de infección en células HFF fueron (1:1, 1:3 y 1:5) bajo el tratamiento con PBMCs de 1 individuo IgG negativo y 1 individuo IgG positivo para *Toxoplasma gondii*. Los datos se representan la media y los valores mínimos y máximos. \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Se aplicó una prueba T para comparar entre los grupos. El experimento se realizó por triplicado de manera independiente con los mismos individuos.

### 6.5. Análisis de enriquecimiento funcional de los genes diferencialmente expresados (DEGs) en la interacción entre *Toxoplasma gondii* y los PBMCs humanos en un modelo *ex vivo*.

Dado la cantidad de datos y con el fin de comprender mejor los resultados y análisis de los productos de secuenciación, a continuación, se presentan los resultados desde una descripción general hacia una descripción más particular y específica, hasta alcanzar un análisis detallado de los genes que particularmente son propuestos como candidatos importantes en la interacción *Toxoplasma*-PBMCs humanos.

### **6.5.1 La interacción entre *T. gondii* RH y los PBMCs humanos es dependiente y variable respecto a la condición Toxo IgG +/- de los PBMCs.**

Los resultados del número de genes diferencialmente expresados (DEGs/  $q$ -value  $< 0.005$ /Foldchange  $\geq 2$ ) en la interacción *Toxoplasma* PBMCs humanos en nuestro modelo de infección *ex vivo* son presentados en la tabla 1. Se encontraron diferencias que dependen de la condición Toxo IgG +/- de los PBMCs y del tiempo de comparación, siendo más notable la diferencia a medida que transcurre el tiempo de la interacción. Al comparar la hora 0 (PBMCs sin infectar) vs la hora 1 pi, se encontraron un total de 197 DEGs en PBMCs crónicos y 121 DEGs en PBMCs negativos, ver tabla 1A. Al comparar la hora 1 vs la hora 6 pi, se encontraron un total de 1043 DEGs en PBMCs crónicos y 1165 DEGs en PBMCs negativos, ver tabla 1B. Al comparar la hora 0 vs la hora 6 pi, se encontraron un total de 2662 DEGs en PBMCs crónicos y 2195 DEGs en PBMCs negativos, ver tabla 1C, resultando en una diferencia de 467 DEGs más en PBMCs crónicos respecto a los PBMCs negativos en esta hora de comparación. Sin embargo, más allá de los números, que ya señalan que existe una diferencia, estábamos interesados en conocer si existían o no diferencias respecto al contenido de las listas de los genes y los procesos biológicos representados en cada uno de los perfiles de expresión y los enriquecimientos correspondientes. En consecuencia, realizamos comparaciones respecto al contenido de los DEGs en las listas de cada grupo (CRO: PBMCs crónicos / IgG+ para toxoplasmosis, NEG: PBMCs negativos / IgG- para toxoplasmosis), entre los grupos y entre los diferentes tiempos, ver Figura 7. Al comparar los grupos CRO vs NEG en 0h vs 1h pi encontramos 42 DEGs compartidos, 156 DEGs que son exclusivos de la condición CRO y 79 DEGs exclusivos en NEG, ver Figura 7A. Al comparar los grupos CRO vs NEG en 1h vs 6h pi encontramos 542 DEGs compartidos, 501 DEGs que son

exclusivos de la condición CRO y 613 DEGs exclusivos en NEG, ver Figura 7B.

Al comparar los grupos CRO vs NEG en 0h vs 6 hpi encontramos 1329 DEGs compartidos, 1287 DEGs que son exclusivos de la condición CRO y 828 DEGs exclusivos en NEG, ver Figura 7C. Todos estos datos, reafirman lo descrito anteriormente con relación al en el número total de DEGs, sugiriendo una vez más que la interacción hospedero parasito en este modelo *ex vivo* está condicionada además del tiempo, por la condición IgG positiva o negativa de los PBMCs humanos, pues el número de DEGS compartidos aunque es importante, en ningún caso sobrepasa al sumatoria del número de genes diferencialmente expresados que son exclusivos en cada grupo y en cada condición.

**Tabla 1.** Número total de genes diferencialmente expresados (DEGs) en PBMCs de individuos crónicos y seronegativos en interacción con *T. gondii*. **DOWN:** genes regulados a la baja. **UP:** genes sobre-expresados. Las dos primeras filas de cada tabla corresponden a los DEGs de los PBMCs humanos y las dos últimas filas de cada tabla corresponden a los DEGS de *Toxoplasma*. **A:** Comparación entre la hora 0 y la hora 1 post-infección. **B:** Comparación entre la hora 1 y la hora 6 post-infección. **C:** Comparación entre la hora 0 y la hora 6 post-infección, (Foldchange  $\geq 2$ ).

Número de DEGs en la interacción entre *T.gondii* y PBMCs humanos en condiciones *ex vivo*

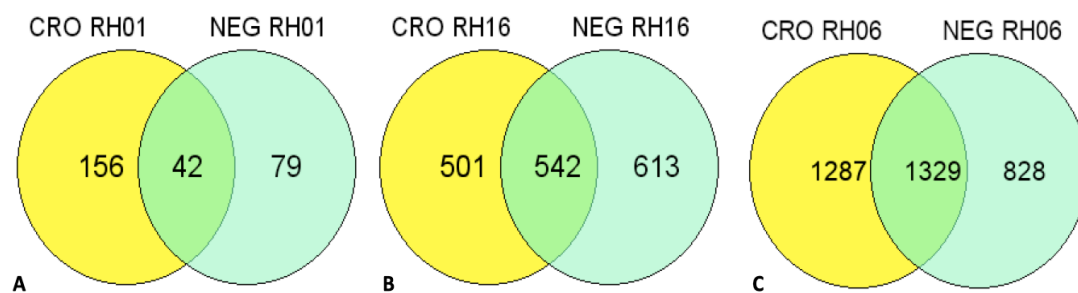
A		0H VS 1H			B		1H VS 6H		
		TOTAL	DOWN	UP			TOTAL	DOWN	UP
CRO/ h-PBMCs		197	103	94	CRO/ h-PBMCs		1043	496	547
NEG/ h-PBMCs		121	47	74	NEG/ h-PBMCs		1165	729	436
CRO / <i>T. gondii</i>		12	1	11	CRO / <i>T. gondii</i>		66	57	9
NEG/ <i>T. gondii</i>		699	391	308	NEG/ <i>T. gondii</i>		427	187	240

C		0H VS 6H		
		TOTAL	DOWN	UP
CRO/ h-PBMCs		2662	1293	1368
NEG/ h-PBMCs		2195	1298	937
CRO / <i>T. gondii</i>		8	2	6
NEG/ <i>T. gondii</i>		986	482	504

q-value < 0.005  
Foldchange ≥ 2

6.5.2 Comparaciones en número de DEGs entre los PBMCs Crónicos y PBMCs negativos al ser infectados por *T. gondii* en un modelo *ex-vivo*



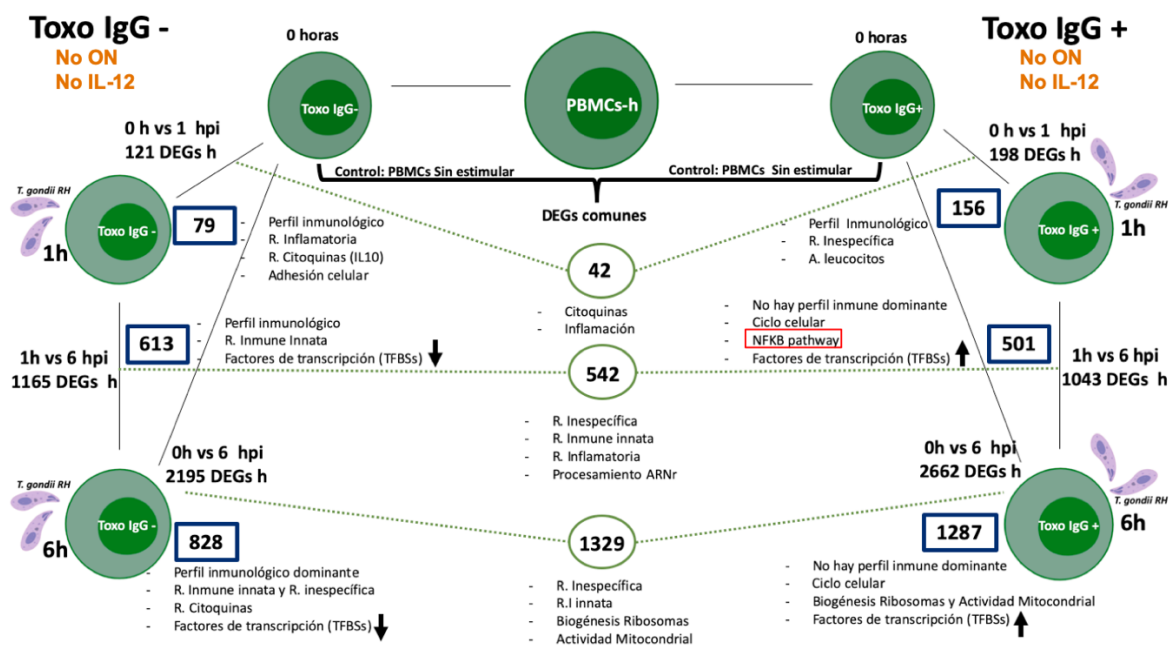
**Figura 7.** Diagramas de Venn de los genes diferencialmente expresados (DEGs) en PBMCs humanos (Foldchange ≥ 2). **A:** Comparación de los DEGs de los PBMCs de individuos Crónicos vs negativos, sin estimular (tiempo 0)



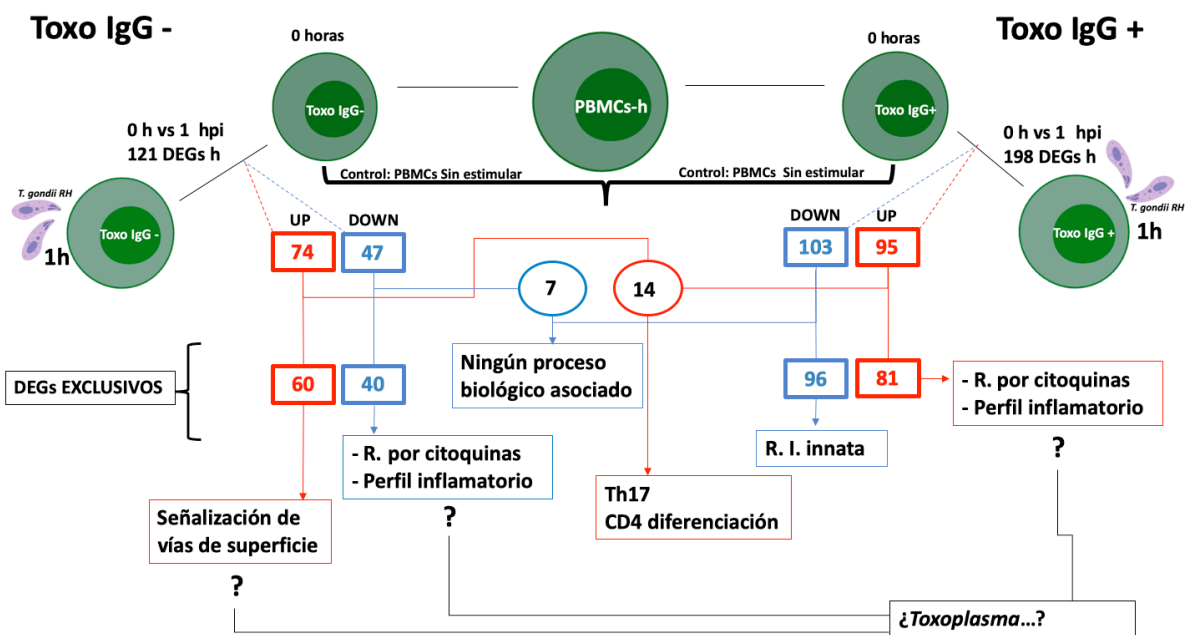
versus estimulados a la 1 hora pi. **B**: Comparación de los DEGs de los PBMCs de individuos Crónicos vs negativos, estimulados a la 1 hora vs 6 horas pi. **C**: Comparación de los DEGs de individuos Crónicos vs negativos, sin estimular (tiempo 0) vs 6 horas pi. Amarillo: DEGs en Crónicos. Azul cian: DEGs en Negativos. La intersección en cada diagrama indica los DEGs compartidos en ambas condiciones experimentales. CRO RH01 significa “CRO” crónicos, “RH” la cepa de *T. gondii* utilizada en el experimento y “01” los tiempos que se están comparando 0 horas PBMCs sin infectar y 1 son PBMCs infectados por 1 hora con *T. gondii* del mismo paciente; de la misma manera operan las demás abreviaturas en cada una de las comparaciones de los diagramas de Venn.

### **6.5.3 El perfil de expresión de los DEGs generados en la interacción *T. gondii* PBMCs humanos difiere respecto al grupo de PBMCs y al tiempo**

Con el fin de conocer y describir las diferencias observadas anteriormente respecto al número total de DEGs, los DEGs compartidos y el número de DEGs exclusivos en cada condición y grupo, realizamos diversos análisis, uno general de enriquecimiento funcional (resumen en figura 8) y un análisis de enriquecimiento funcional UP-DOWN (resumen en figura 9), todos los análisis se realizaron utilizando los programas (**g:Profiler**) <https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost> **REACTOME**: <https://reactome.org/> ) y análisis de redes de interacción proteína-proteína (**STRING**: <https://string-db.org/>).



**Figura 8.** Resumen de el análisis de RNA-seq de PBMCs-h infectados con *T. gondii* RH en *MExSs*



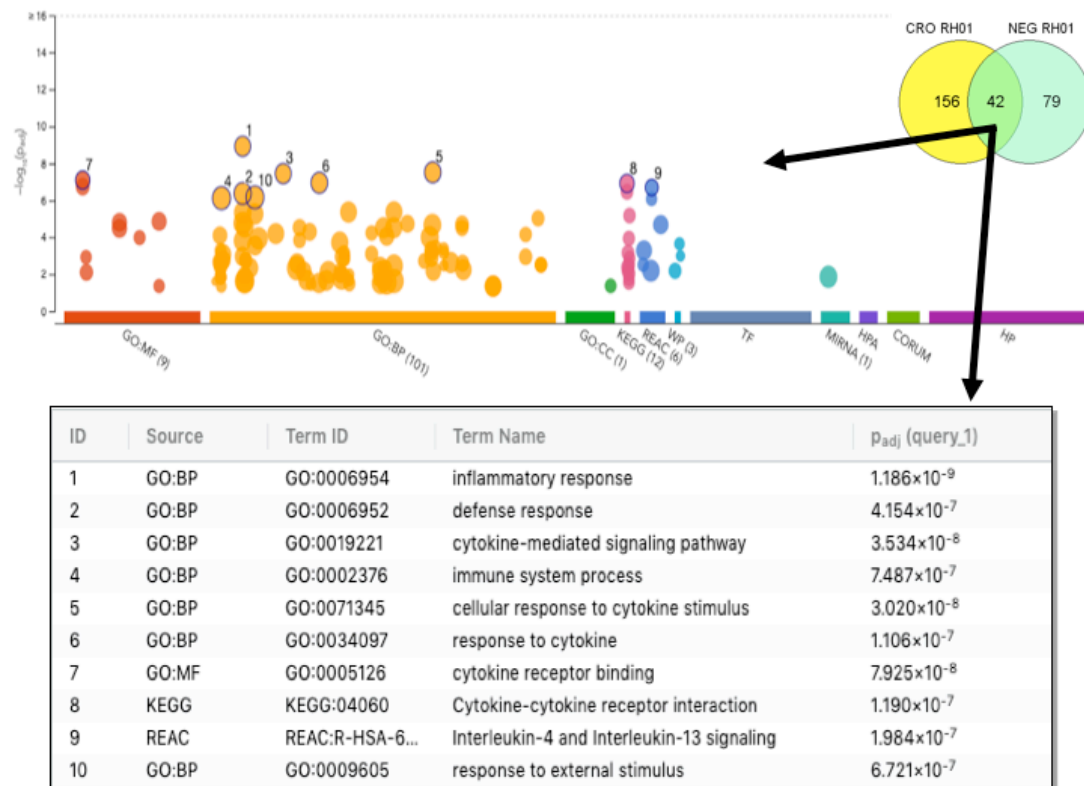
**Figura 9.** Resumen del análisis de RNA-seq DEGs UP y DOWN en 0h vs 1 hpi en PBMCs-h infectados con *T. gondii* RH en *MExSs*

**6.5.3.1 El perfil común presentado por los DEGs de PBMCs humanos a las 0 horas (no infectados) vs 1 hora post infección en el modelo *ex vivo*, es un perfil inflamatorio mediado por citoquinas y quimiocinas**

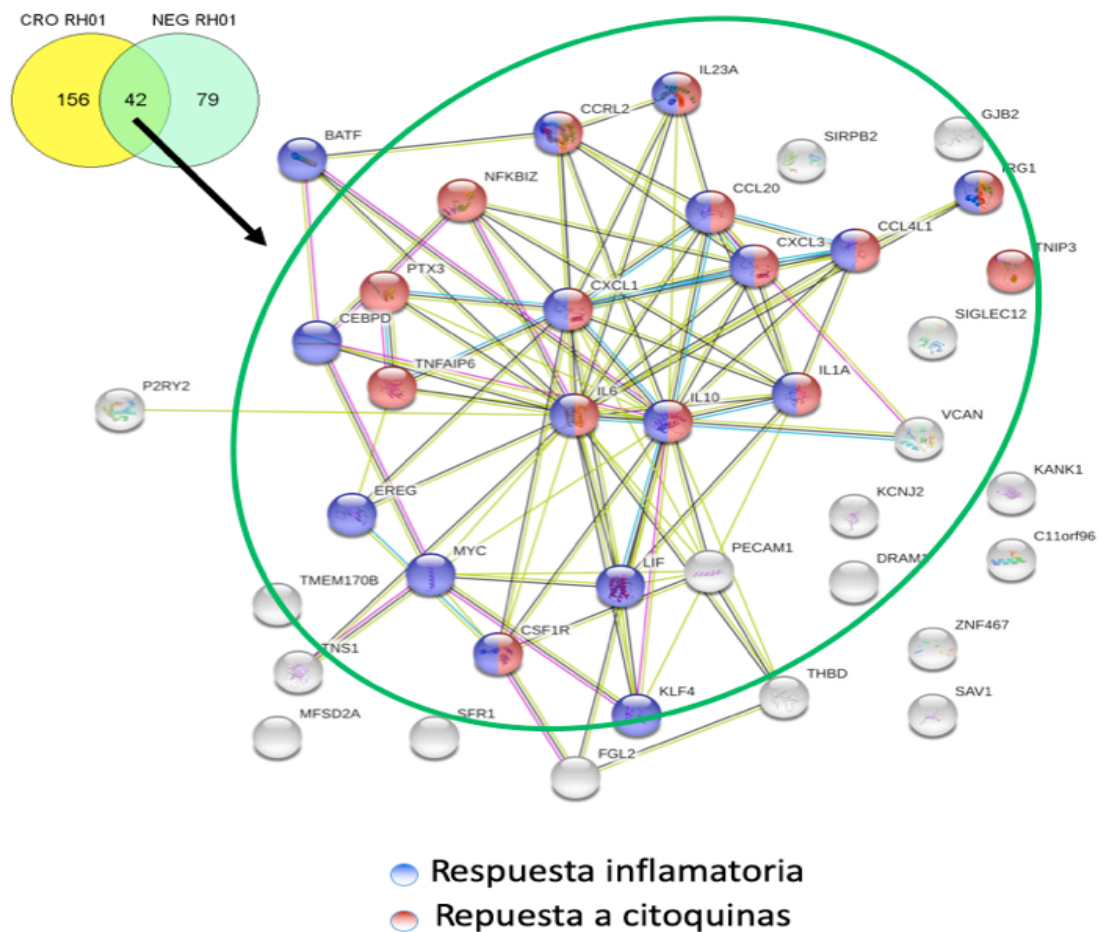
Se encontró en los análisis de enriquecimiento funcional que los 42 DEGs compartidos en común entre CRO y NEG a la primera hora de infección están relacionados principalmente con respuesta inflamatoria ver **Figura 10** y **Figura 11**, destacándose la presencia de algunos genes de citoquinas importantes en la respuesta inmune como la IL10, IL1A, IL23A, IL6 y destacándose quimiocinas como CXCL1, CXCL2, CCRL2, CCL4L1 y CCL20 entre otros, ver **Tabla 2**. A pesar de no estar presentes en el listado la IL4 y la IL13 aparecen como posibles blancos de alteración según análisis de enriquecimiento funcional en el REACTOMA, **Figura 12**.

**Tabla 2.** Lista de DEGs humanos que son compartidos en CRO y NEG en la primera hora de interacción entre *T. gondii* y los PBMCs humanos. Rojo algunas de los genes destacados y relacionados a la respuesta inflamatoria.

42 DEGs compartidos en CRO vs NEG RH 01			
ACOD1	EREG	MFSD2A	SIGLEC12
BATF	FGL2	MIR155HG	SIRPB2
C11orf96	GJB2	MIR3142HG	THBD
CCL20	IL10	MIR3945HG	TMEM170B
CCL4L1	IL1A	MYC	TNFAIP6
CCRL2	IL23A	NFKBIZ	TNIP3
CEBPD	IL6	P2RY2	TNS1
CSF1R	KANK1	PECAM1	VCAN
CXCL1	KCNJ2	PTX3	ZNF467
CXCL3	KLF4	SAV1	
DRAM1	LIF	SFR1	



**Figura 10.** Análisis de enriquecimiento funcional de los 42 DEGs humanos compartidos entre los PBMCs Crónicos y PBMCs Negativos en la primera hora de infección por *T. gondii* (**gProfiler**). **1-10**: Principales procesos enriquecidos. **GO:BP** Ontología de genes : Procesos Biológicos. **GO:MF** Ontología de genes Función molecular. **KEEG**: Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto. **REAC**: Reactoma. **TF**: Transfactor para evaluación de motivos de unión a factores de transcripción. **MIRNA**: Micro RNAs.



**Figura 11.** Análisis de la interacción Proteína - Proteína realizada en el servidor **STRING** (índice:0.7, azul y violeta: evidencia experimental, verde, roja y azul cian: interacción predictiva, amarillo, azul oscuro y negro: otras interacciones) de los 42 DEGs humanos compartidos entre los PBMCs Crónicos y PBMCs Negativos en la primera hora de infección por *T. gondii*. Azul: respuesta inflamatoria, Rojo: respuesta a citoquinas .



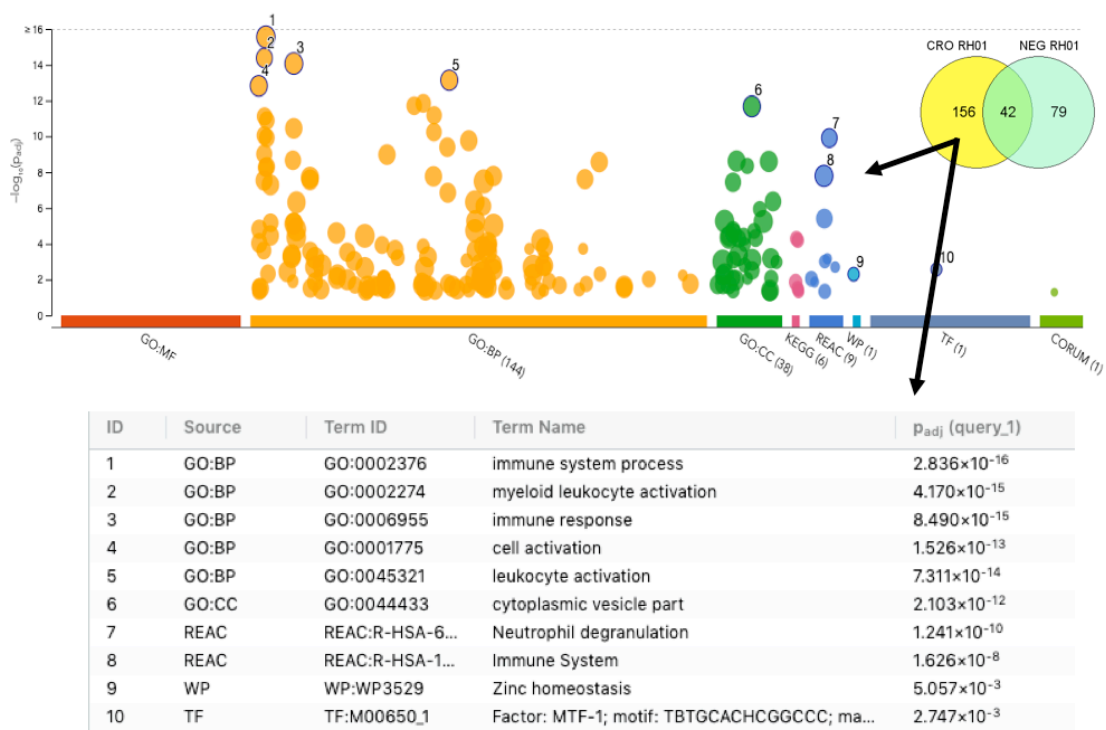
“GTPasas”, proteínas que suelen estar relacionadas con el encendido o apagado de la traducción de señales, **ver Figura 14**.

**Tabla 3.** Lista de DEGs humanos que son exclusivos en CRO en la primera hora de interacción entre *T. gondii* y los PBMCs humanos.

156 DEGs exclusivos en CRO en la primera hora de interacción de los PBMCs con <i>T.gondii</i>							
<a href="#">ADAP2</a>	<a href="#">CD1D</a>	<a href="#">DEFA3</a>	<a href="#">GIMAP7</a>	<a href="#">IQSEC1</a>	<a href="#">MIR155</a>	<a href="#">PGAP1</a>	<a href="#">SORT1</a>
<a href="#">ADCY9</a>	<a href="#">CD33</a>	<a href="#">DOCK4</a>	<a href="#">GIMAP8</a>	<a href="#">ITGA6</a>	<a href="#">MMP14</a>	<a href="#">PGLYRP1</a>	<a href="#">SSH2</a>
<a href="#">AK5</a>	<a href="#">CDA</a>	<a href="#">DPM2</a>	<a href="#">GLT1D1</a>	<a href="#">ITGAV</a>	<a href="#">MMP8</a>	<a href="#">PLXNB2</a>	<a href="#">SYNPO2</a>
<a href="#">ALDH3B1</a>	<a href="#">CDC14A</a>	<a href="#">DYRK3</a>	<a href="#">GPNMB</a>	<a href="#">JAK2</a>	<a href="#">MPEG1</a>	<a href="#">PRAM1</a>	<a href="#">THEMIS2</a>
<a href="#">APOE</a>	<a href="#">CDCA4</a>	<a href="#">E2F7</a>	<a href="#">GPR15</a>	<a href="#">KDM7A-DT</a>	<a href="#">MPO</a>	<a href="#">PSAT1</a>	<a href="#">TLR8</a>
<a href="#">ATP8B4</a>	<a href="#">CEP152</a>	<a href="#">ERG</a>	<a href="#">GRB10</a>	<a href="#">KLHL21</a>	<a href="#">MRTFB</a>	<a href="#">PTGS2</a>	<a href="#">TMEM131L</a>
<a href="#">BPI</a>	<a href="#">CEP85L</a>	<a href="#">FAM111A</a>	<a href="#">GRK4</a>	<a href="#">LCN2</a>	<a href="#">MT1E</a>	<a href="#">PTPN6</a>	<a href="#">TMEM176B</a>
<a href="#">BST1</a>	<a href="#">CLEC12B</a>	<a href="#">FAM71F2</a>	<a href="#">GZF1</a>	<a href="#">LILRA6</a>	<a href="#">MT1F</a>	<a href="#">PYGL</a>	<a href="#">TNFAIP8</a>
<a href="#">BTBD11</a>	<a href="#">CMSS1</a>	<a href="#">FGD2</a>	<a href="#">HAVCR1</a>	<a href="#">LINC00926</a>	<a href="#">MT1X</a>	<a href="#">R3HDM2</a>	<a href="#">TNFSF13B</a>
<a href="#">CACNA1G</a>	<a href="#">CNR1</a>	<a href="#">FIG4</a>	<a href="#">HDAC9</a>	<a href="#">LOC101929819</a>	<a href="#">MT2A</a>	<a href="#">RALGPS2</a>	<a href="#">TNFSF8</a>
<a href="#">CACNA1I</a>	<a href="#">CPPED1</a>	<a href="#">FLT3</a>	<a href="#">HEY1</a>	<a href="#">LOC105369313</a>	<a href="#">MTM1</a>	<a href="#">RIPOR2</a>	<a href="#">TRABD2A</a>
<a href="#">CAMP</a>	<a href="#">CR1</a>	<a href="#">FSPSB1</a>	<a href="#">HK2</a>	<a href="#">LOC105369890</a>	<a href="#">MYOF</a>	<a href="#">RNF144A</a>	<a href="#">TRAF1</a>
<a href="#">CAMSAP2</a>	<a href="#">CRTC3</a>	<a href="#">FYB1</a>	<a href="#">HLA-B</a>	<a href="#">LOC105370259</a>	<a href="#">NACC2</a>	<a href="#">RRAD</a>	<a href="#">TTBK2</a>
<a href="#">CCDC144A</a>	<a href="#">CSF2</a>	<a href="#">GAS7</a>	<a href="#">HLA-C</a>	<a href="#">LOC400499</a>	<a href="#">NCF1</a>	<a href="#">RUFY3</a>	<a href="#">TXK</a>
<a href="#">CCL17</a>	<a href="#">CSF3</a>	<a href="#">GATM</a>	<a href="#">HLA-DMB</a>	<a href="#">LRP1</a>	<a href="#">NFAM1</a>	<a href="#">SCIMP</a>	<a href="#">UCP2</a>
<a href="#">CCL22</a>	<a href="#">CTSG</a>	<a href="#">GEM</a>	<a href="#">HLA-DRA</a>	<a href="#">LRRC6</a>	<a href="#">NKD1</a>	<a href="#">SIGLEC1</a>	<a href="#">ZFP90</a>
<a href="#">CCL3L1</a>	<a href="#">CXCL</a>	<a href="#">GIMAP1</a>	<a href="#">HLA-DRB3</a>	<a href="#">LRRK2</a>	<a href="#">NOD1</a>	<a href="#">SLC11A1</a>	
<a href="#">CCR1</a>	<a href="#">CYBB</a>	<a href="#">GIMAP4</a>	<a href="#">HOMER1</a>	<a href="#">MARCHF1</a>	<a href="#">NOG</a>	<a href="#">SLC22A1</a>	
<a href="#">CD163</a>	<a href="#">CYTH4</a>	<a href="#">GIMAP5</a>	<a href="#">HRH2</a>	<a href="#">MEGF9</a>	<a href="#">OLFM4</a>	<a href="#">SLC24A4</a>	
<a href="#">CD177</a>	<a href="#">DAPK1</a>	<a href="#">GIMAP6</a>	<a href="#">HSPA6</a>	<a href="#">MIR146A</a>	<a href="#">PDE4DIP</a>	<a href="#">SLC30A1</a>	

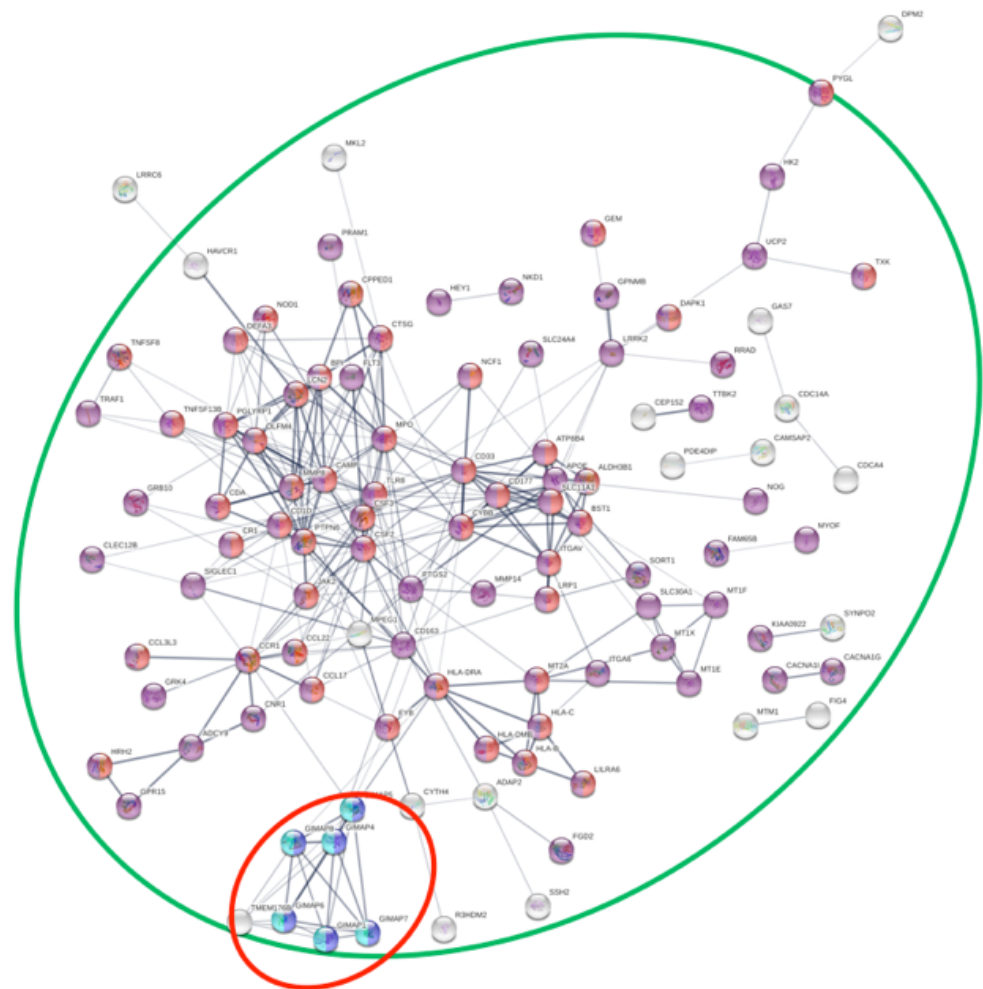
En relación con la infección de *T. gondii* sobre los PBMCs humanos NEG donde se presentaron 79 DEGs exclusivos, se observó que el perfil difiere claramente del que se presentó en CRO en el mismo tiempo de comparación, **ver Figura 15**. En NEG, los perfiles de expresión aparecen más relacionados a una respuesta inmune inflamatoria, sumado a otras categorías con funciones biológicas importantes como la “regulación en la producción de citoquinas” y “regulación de la adhesión celular”, **ver Figura 16**. De manera similar a lo encontrado en CRO, el análisis de interacción proteína-proteína mostró que los DEGs exclusivos de NEG se presentan varios genes de procesos generalizados como la categoría “respuesta a estímulos”, **ver Figura 17**.





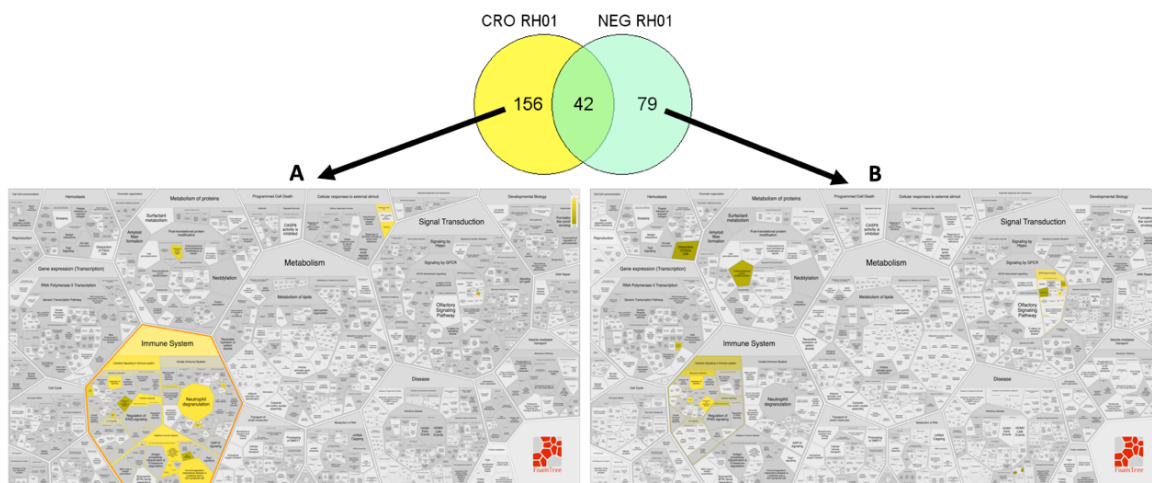
**Figura 13.** Análisis de enriquecimiento funcional de 156 DEGs humanos que solo se presentan en los PBMCs Crónicos en la primera hora de infección por *T. gondii* (gProfiler). 1-10: Principales procesos enriquecidos. **GO:BP** Ontología de genes: Procesos Biológicos. **GO:MF** Ontología de genes Función molecular. **KEEG**: Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto. **REAC**: Reactoma. **TF**: Transfactor para evaluación de motivos de unión a factores de transcripción.





● Respuesta a estímulos   
 ● GTPasas   
 ● Respuesta inmune

**Figura 14.** Análisis de la interacción Proteína-Proteína realizada en el servidor **STRING** (índice:0.7) de los 156 DEGs humanos que solo se presentan en los PBMCs en la primera hora de infección por *T. gondii*. Azul cian: GTPasas, Rojo: respuesta inmune, violeta Respuesta a estímulos.



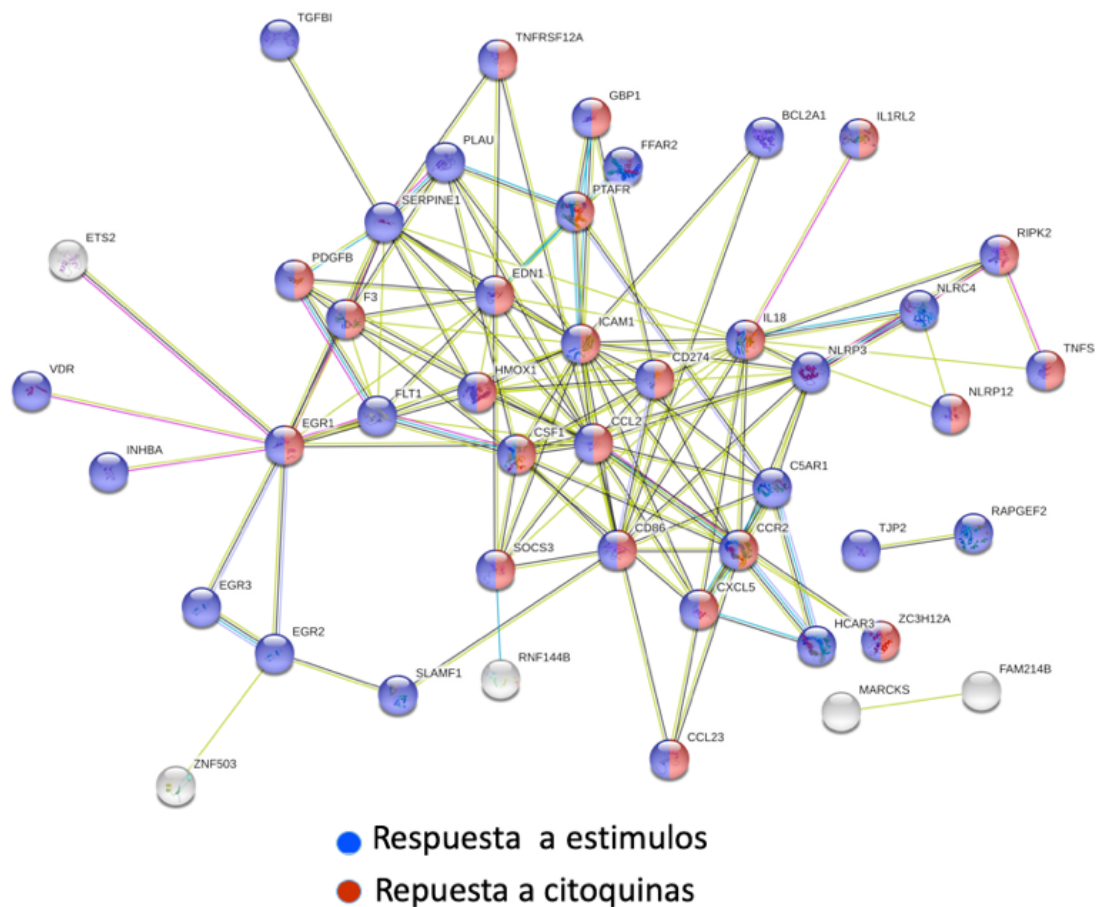
**Figura 15. REACTOMA:** Comparación del Análisis de enriquecimiento funcional de los 156 DEGs de PBMCs humanos exclusivos en los PBMCs crónicos (**A**) frente a los 79 DEGs humanos exclusivos en los PBMCs negativos (**B**) en la primera hora de infección por *T. gondii*. **Inmune System:** Sistema inmune.

**Tabla 4.** Lista de DEGs humanos que son exclusivos (79) en NEG en la primera hora de interacción entre *T. gondii* y los PBMCs humanos.

<a href="#">ABL2</a>	<a href="#">CSF1</a>	<a href="#">F3</a>	<a href="#">KANSL1</a>	<a href="#">RASD2</a>	<a href="#">VDR</a>
<a href="#">ADORA2A</a>	<a href="#">CXCL2</a>	<a href="#">FAM214B</a>	<a href="#">KCNJ15</a>	<a href="#">RGS12</a>	<a href="#">ZC3H12A</a>
<a href="#">ARAP3</a>	<a href="#">CXCL5</a>	<a href="#">FFAR2</a>	<a href="#">LOC100128059</a>	<a href="#">RIN2</a>	<a href="#">ZC3H12C</a>
<a href="#">AVPI1</a>	<a href="#">CYP2S1</a>	<a href="#">FLT1</a>	<a href="#">LOC100294336</a>	<a href="#">RIPK2</a>	<a href="#">ZNF503</a>
<a href="#">BCL2A1</a>	<a href="#">DAGLA</a>	<a href="#">GOS2</a>	<a href="#">LOC107987373</a>	<a href="#">RNF144B</a>	
<a href="#">C5AR1</a>	<a href="#">DGAT2</a>	<a href="#">GBP1</a>	<a href="#">LRRC25</a>	<a href="#">SERPINE1</a>	
<a href="#">CCL2</a>	<a href="#">DNAJB5</a>	<a href="#">HCAR3</a>	<a href="#">MARCKS</a>	<a href="#">SLAMF1</a>	
<a href="#">CCL23</a>	<a href="#">DNMBP</a>	<a href="#">HLX</a>	<a href="#">NLRC4</a>	<a href="#">SLC37A2</a>	
<a href="#">CCL3P1</a>	<a href="#">DOK3</a>	<a href="#">HMOX1</a>	<a href="#">NLRP12</a>	<a href="#">SOCS3</a>	
<a href="#">CCR2</a>	<a href="#">EDN1</a>	<a href="#">ICAM1</a>	<a href="#">NLRP3</a>	<a href="#">ST3GAL6</a>	
<a href="#">CD101</a>	<a href="#">EGR1</a>	<a href="#">IL18</a>	<a href="#">PDGFB</a>	<a href="#">TGFB1</a>	
<a href="#">CD274</a>	<a href="#">EGR2</a>	<a href="#">IL1RL2</a>	<a href="#">PLAU</a>	<a href="#">TJP2</a>	
<a href="#">CD86</a>	<a href="#">EGR3</a>	<a href="#">INAFM2</a>	<a href="#">PSPHP1</a>	<a href="#">TNFRSF12A</a>	
<a href="#">CDCP1</a>	<a href="#">EIF1B</a>	<a href="#">INHBA</a>	<a href="#">PTAFR</a>	<a href="#">TNFSF15</a>	
<a href="#">CHAC1</a>	<a href="#">ETS2</a>	<a href="#">ITGB8</a>	<a href="#">RAPGEF2</a>	<a href="#">TRIP10</a>	



**Figura 16.** Análisis de enriquecimiento funcional de los 79 DEGs humanos que solo se presentan en los PBMCs negativos en la primera hora de infección por *T. gondii* (gProfiler). 1-10: Principales procesos enriquecidos. **GO:BP** Ontología de genes : Procesos Biológicos. **GO:MF** Ontología de genes Función molecular. **KEEG**: Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto. **REAC**: Reactoma.



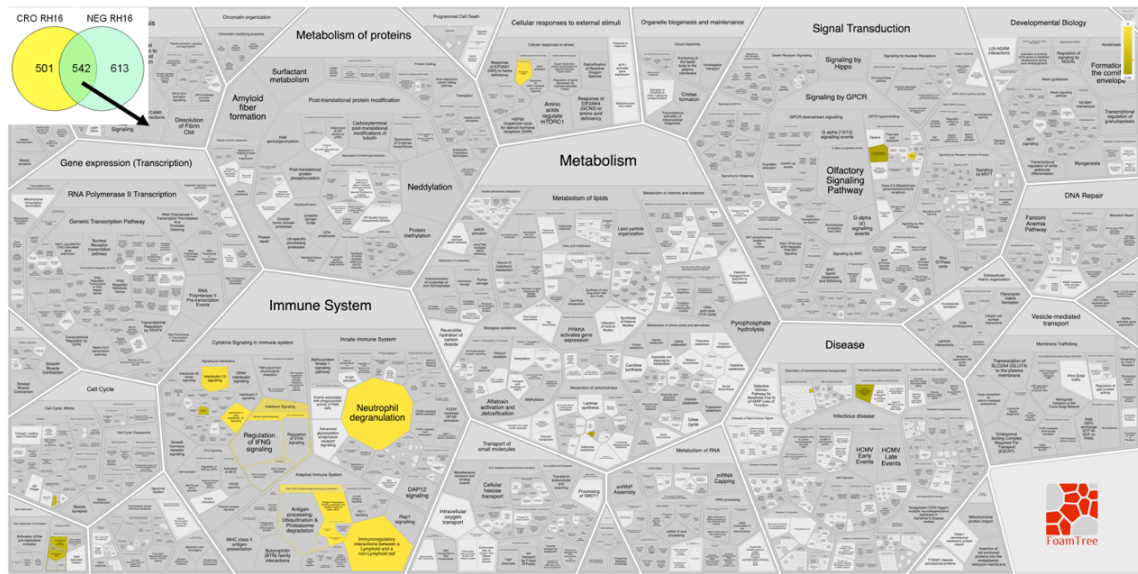
**Figura 17.** Análisis de la interacción Proteína - Proteína realizada en el servidor **STRING** (índice:0.7, azul y violeta: evidencia experimental, verde, roja y azul cian: interacción predictiva, amarillo, azul oscuro y negro: otras interacciones) de los (79) DEGs humanos que solo se presentan en los PBMCs negativos en la primera hora de infección por *T. gondii*. Azul: Respuesta a estímulos; Rojo: respuesta a citoquinas.

### **6.5.3.3 Un perfil de respuesta inmune innata y fenómenos inflamatorios son los procesos más enriquecidos en la dinámica (1 hora vs 6 hora pi) en la interacción *Toxoplasma*-PBMCs-h en el modelo *ex vivo***

La expresión de genes es un fenómeno altamente sensible al tiempo, pues en cada momento puede presentarse un contexto que desencadene el aumento o disminución de su expresión, por lo tanto, buscamos observar si el perfil de expresión observado en la primera hora de interacción *Toxoplasma*-PBMCs humanos cambiaba respecto a la hora 6 horas pi. En los análisis de enriquecimientos realizados respecto a los DEGs compartidos 542 en ambos grupos (**Anexo 8**), encontramos varios procesos relacionados a perfiles inmunológicos inespecíficos, destacándose categorías como “respuesta al stress”, “respuesta a estímulos” y activación de leucocitos, ver **Figura 18** o “degranulación de neutrófilos”, ver **Figura 19**. Al realizar los análisis de interacción proteína-proteína se observa al menos 2 clúster muy fuertes y consistentes indicando que la función biológica predominante es la respuesta inmune innata ver **Figura 20**. En este mismo análisis se observa de manera interesante un clúster enriquecido con moléculas relacionadas al “procesamiento de ARN ribosomal”.

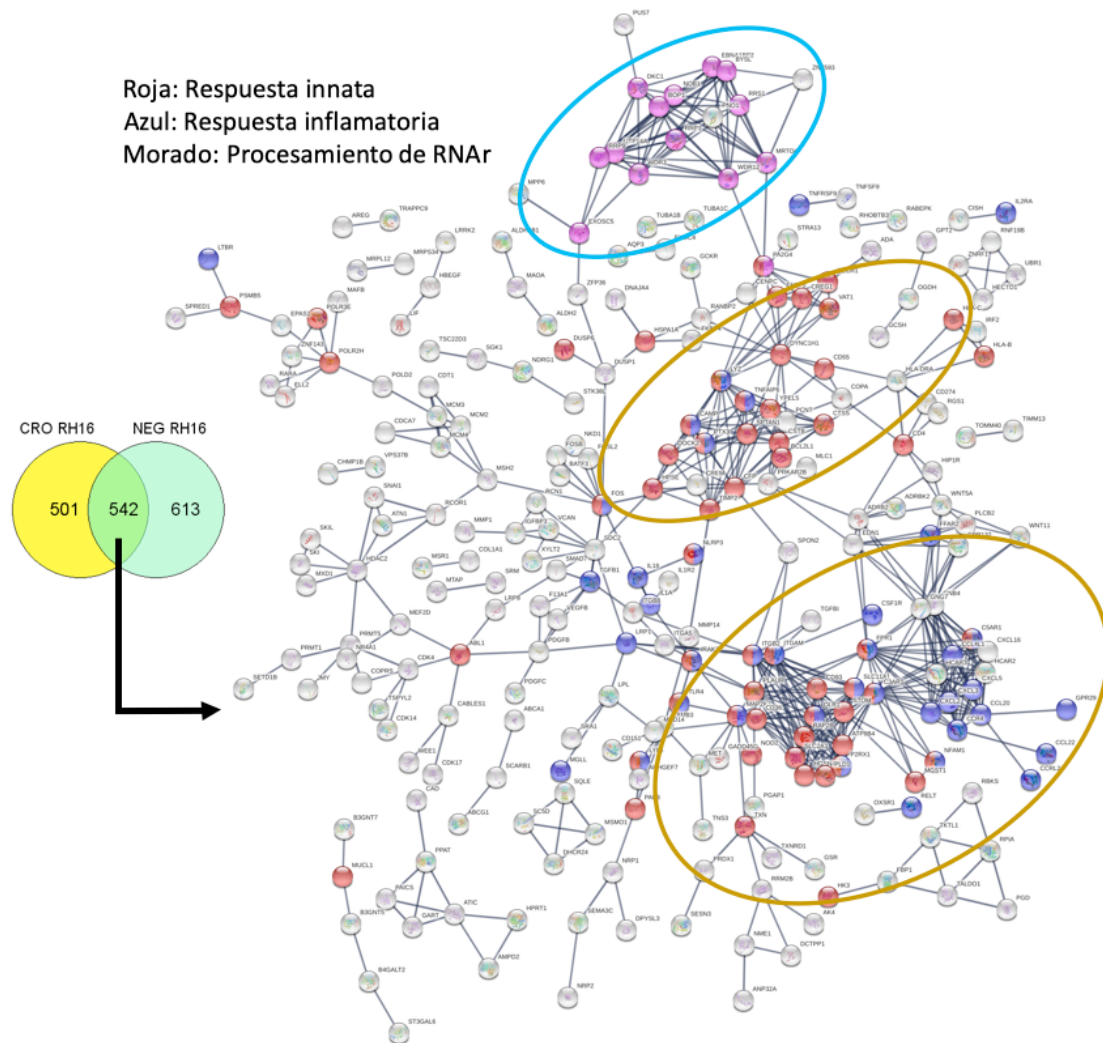


**Figura 18.** Análisis de enriquecimiento funcional de los 542 DEGs humanos compartidos entre los PBMCs Crónicos y PBMCs Negativos entre la primera hora y la sexta hora post-infección de *T. gondii* (**gProfiler**). **1-10**: Principales procesos enriquecidos. **GO:BP** Ontología de genes : Procesos Biológicos. **GO:MF** Ontología de genes Función molecular. **KEEG**: Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto. **REAC**: Reactoma. **TF**: Web Server Transfactor para evaluación de motivos de unión a factores de transcripción. **MIRNA**: Micro RNAs.



**Figura 19. REACTOMA:** Análisis de enriquecimiento funcional de los 542 DEGs humanos compartidos entre los PBMCs Crónicos y PBMCs Negativos al comparar la primera y sexta hora post-infección con *T. gondii*. **Immune System:** Sistema inmune.



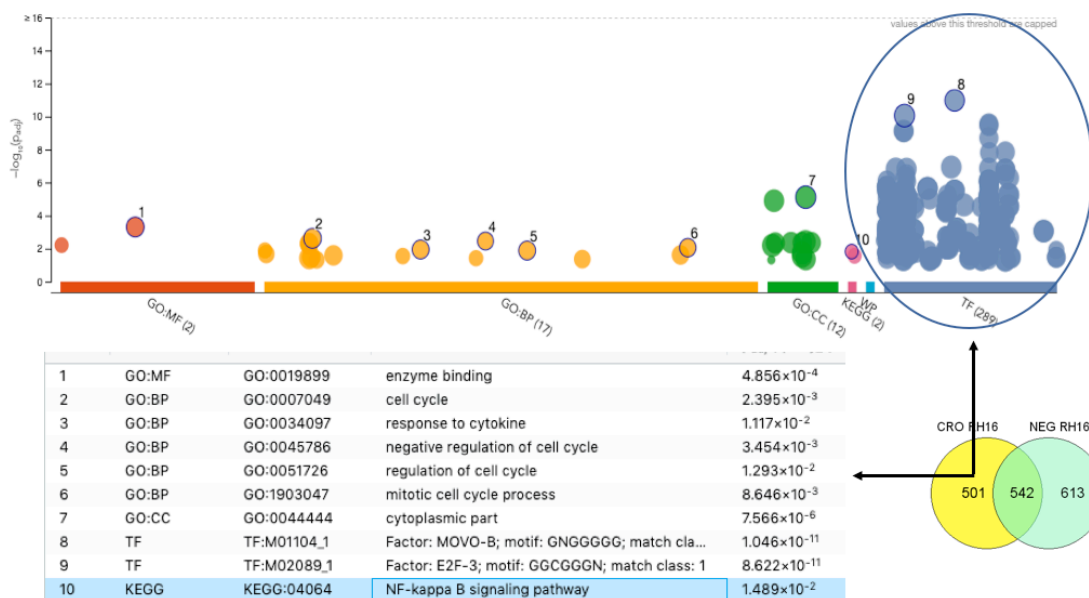


**Figura 20.** Análisis de la interacción Proteína–Proteína realizada en el servidor **STRING** (índice:0.9) de los (542) DEGs humanos en PBMCs compartidos en Crónicos y Negativos al comparar la primera y la sexta hora post-infección con *T. gondii*.

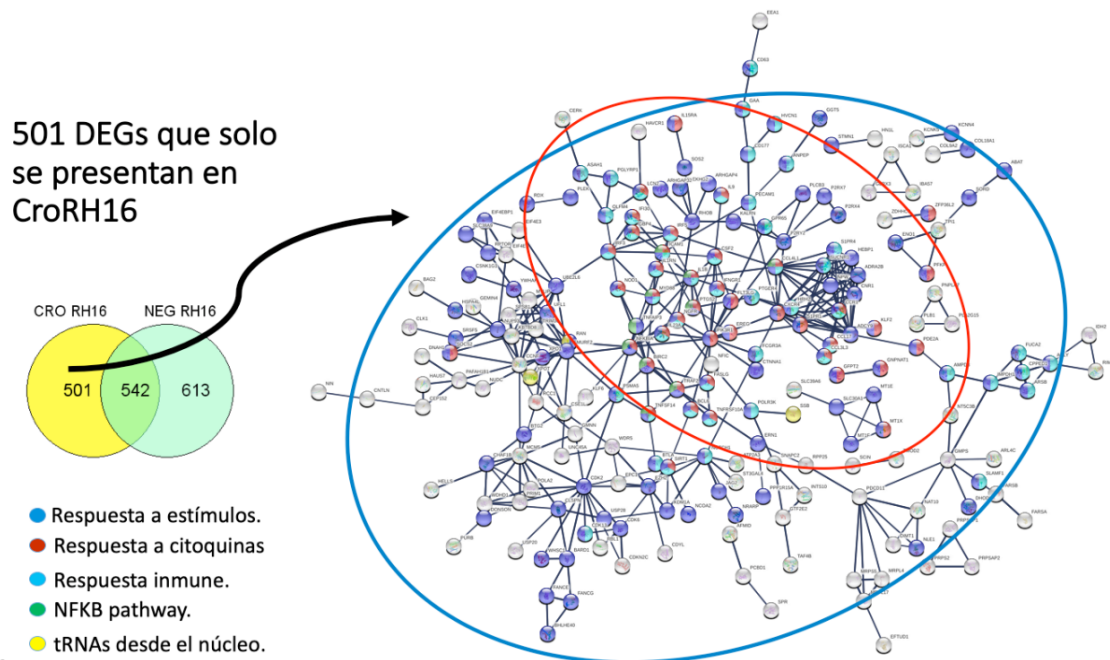
El enriquecimiento funcional de los 501 DEGs exclusivos (**Anexo 9**) presentados en CRO en la dinámica 1 vs 6 hpi, se encontró de manera interesante que no hay ningún perfil inmunológico dominante relacionado, ver **Figura 21**, y los pocos procesos moderadamente enriquecidos que se



presentaron están relacionados al parecer con el “ciclo celular”; lo que si se observó de manera interesante en estos 501 genes exclusivos en CRO, es un enriquecimiento con un marcado perfil de factores de transcripción (TF), **Figura 21**. En los análisis de enriquecimiento de interacción proteína-proteína no se observó ningún proceso específico, exceptuado por un enriquecimiento en la vía del NF-kB, ver **Figura 21 y 22**.

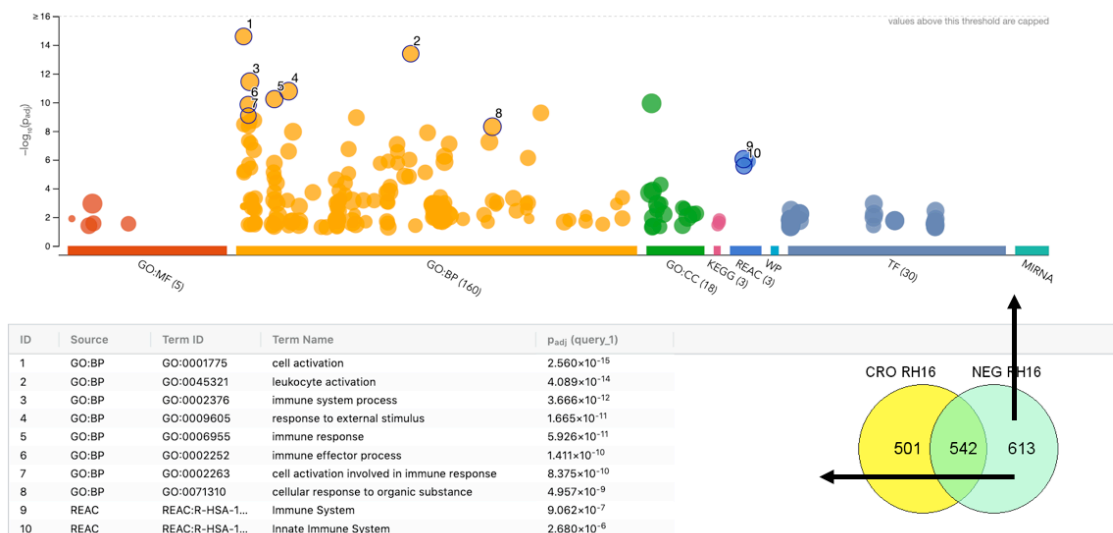


**Figura 21.** Análisis de enriquecimiento funcional de los 501 DEGs humanos que solo se presentan en los PBMCs Crónicos cuando se compara la primera hora versus la sexta hora de infección con *T. gondii* (gProfiler). **1-10:** Principales procesos enriquecidos. **GO:BP** Ontología de genes : Procesos Biológicos. **GO:MF** Ontología de genes Función molecular. **KEEG:** Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto. **REAC:** Reactoma. **TF:** web Server Transfactor para evaluación de motivos de unión a factores de transcripción.

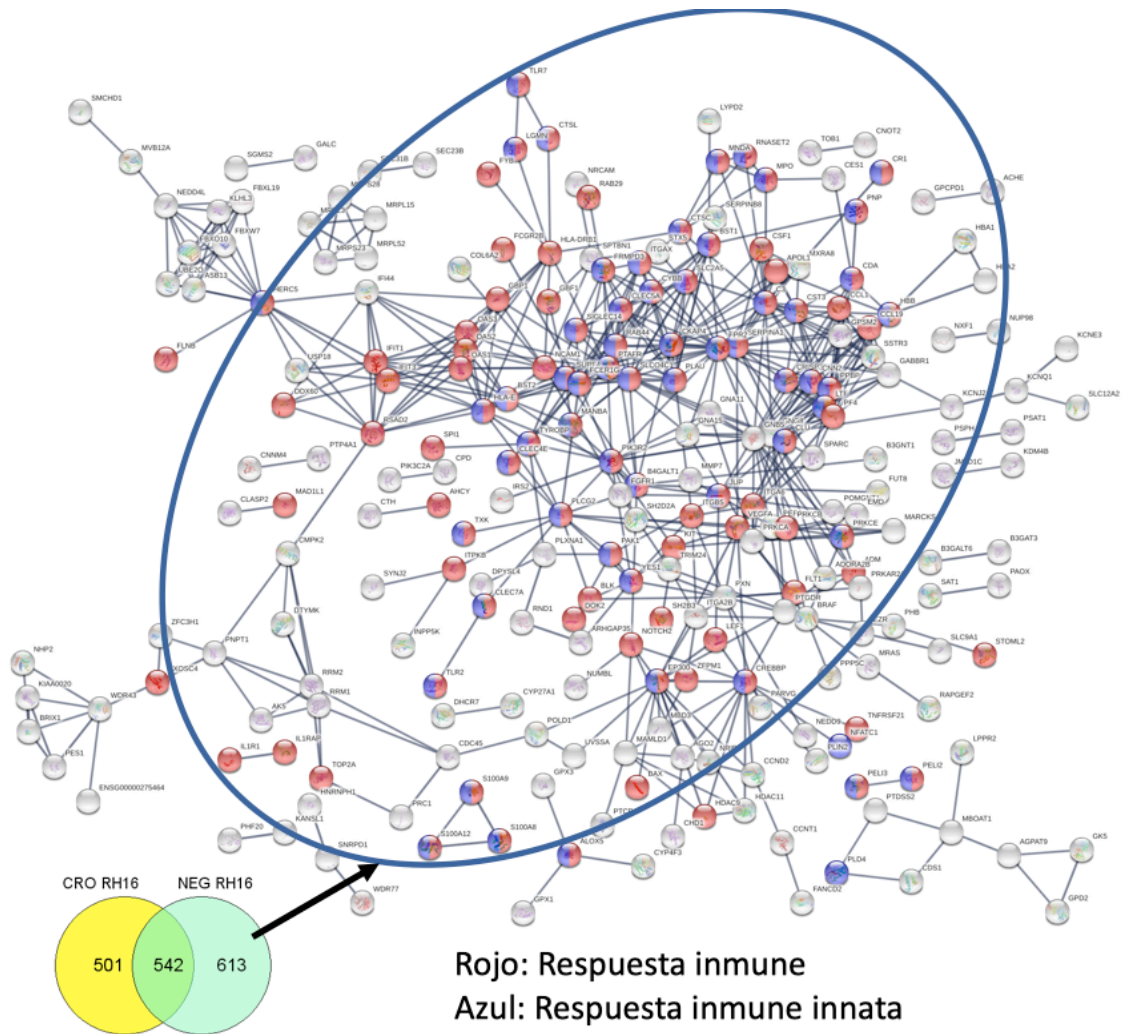


**Figura 22.** Análisis de la interacción Proteína–Proteína realizada en el servidor **STRING** (índice:0.9) de los 501 DEGs humanos en PBMCs Crónicos que se presentan al comparar la primera y la sexta hora post-infección con *T. gondii*.

Con relación al análisis de enriquecimiento funcional en los 613 DEGs exclusivos en NEG (**Anexo 10**) se observó un perfil inmunológico con categorías bien representadas tales como “activación de leucocitos” y “procesos inmunes efectores”, **Figura 23**. En cuanto al análisis de interacción proteína-proteína se observó un clúster soportado por más de 60 moléculas relacionadas a la inmunidad innata, **Figura 25**.



**Figura 23.** Análisis de enriquecimiento funcional de los 613 DEGs humanos que solo se presentan en los PBMCs Negativos cuando se compara la primera hora versus la sexta hora de infección con *T. gondii* (**gProfiler**). **1-10:** Principales procesos enriquecidos. **GO:BP** Ontología de genes : Procesos Biológicos. **GO:MF** Ontología de genes Función molecular. **KEEG:** Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto. **REAC:** Reactoma. **TF:** Transfactor web Server para evaluación de motivos de unión a factores de transcripción.

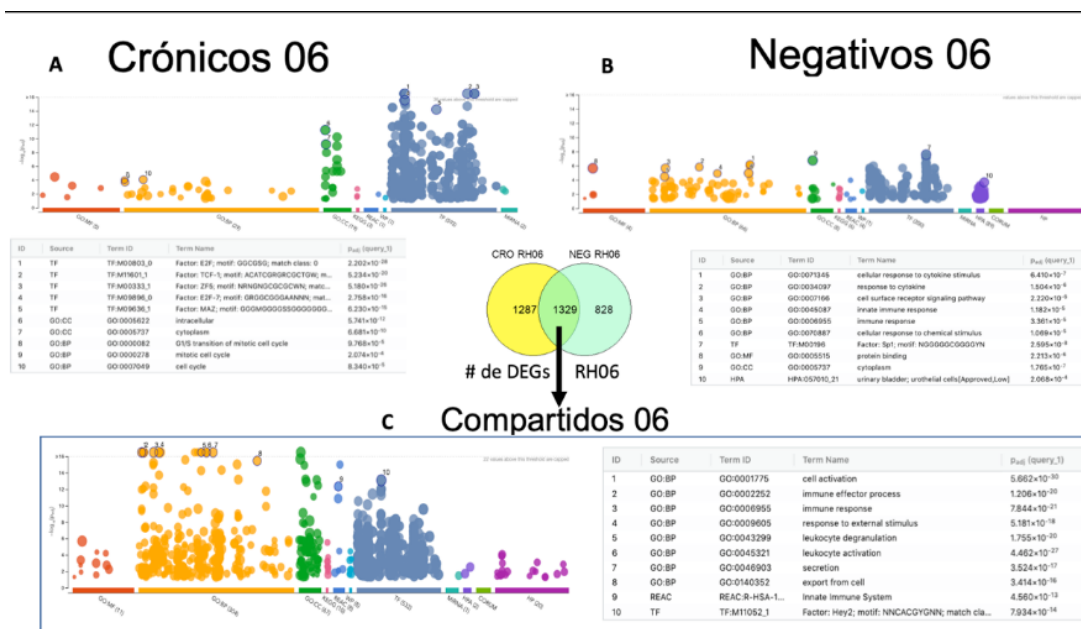


**Figura 24.** Análisis de la interacción Proteína–Proteína realizada en el servidor **STRING** (índice:0.9) de los (613) DEGs humanos en PBMCs negativos que se presentan al comparar la primera y la sexta hora post-infección con *T. gondii*.

#### **6.5.3.4 Los motivos de unión a factores de transcripción (TFBSs) pueden ser los principales responsables de las diferencias en el enriquecimiento funcional respecto a las diferencias encontradas en la interacción de *T. gondii* con PBMCs CRO frente a PBMCs NEG en la dinámica de 0 horas (no infectados) vs 6 hora pi en un modelo *ex vivo***

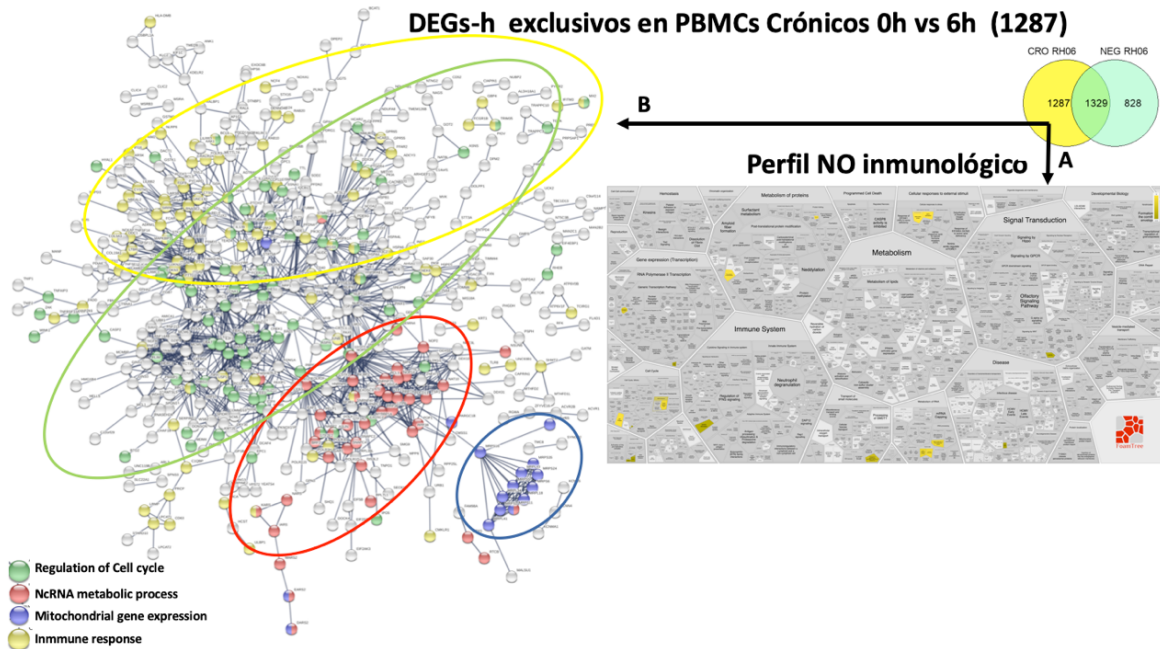
Los análisis de la hora 0 vs la hora 6 pi arrojó datos de cientos y miles de genes diferencialmente expresados en todas las comparaciones, confirmando que la condición de ser PBMCs *Toxoplasma* IgG+ o PBMCs *Toxoplasma* IgG - afectan los perfiles de expresión en la interacción con el parásito; ya que en términos de DEGs totales hay 459 DEGs más en CRO ver **Anexo 11**, que en NEG ver **anexo 12**, y en términos de procesos biológicos como hemos visto en los tiempos de comparación anterior y como mostraremos en este tiempo, son dos universos genéticos totalmente distintos, ver **Figura 25**. A pesar de presentarse 1287 DEGs exclusivos en CRO, sorprendentemente no se presenta un perfil inmune dominante; en lugar de ello se observó un enriquecimiento funcional muy marcado en varias categorías relacionadas con “ciclo celular”, **Figura 25** y **Figura 26 A** y **26 B**. En contraste los 828 DEGs exclusivos en NEG si presentan un perfil inmune dominante, ver **Figura 25** y **27**, representado principalmente por categorías como “respuesta a citoquinas”, “respuesta inmune” y “respuesta inmune innata”, ver **Figura 27**. Al analizar los 1329 DEGs (**Anexo 13**) que se encontraron en común en ambos grupos de PBMCs humanos (CRO y NEG) en este punto de la dinámica de comparación, se observó un enriquecimiento predominante relacionado a categorías más generalizadas como “activación celular”, “activación de leucocitos”, “respuesta a estímulos externos” y “respuesta inmune innata” **Figura 25** y **28**. En el análisis de enriquecimiento de la interacción proteína-proteína se observó además 2 clústeres con un buen número de genes relacionados, uno de ellos relacionado a la “biogénesis de Ribosomas” y el otro relacionado a “expresión de genes mitocondriales, ver **Figura 28**. Sin embargo, uno de los resultados

más notorio y sorprendente en este tiempo de comparación, fue la evidente diferencia entre CRO y NEG respecto al enriquecimiento mostrado con el servidor TRANSFAC que se encarga de evidenciar los TFBSs (motivos de unión a factores de transcripción) presentes en las listas de genes diferencialmente expresados, presentándose 601 TFBSs en los DEGs CRO siendo el doble en comparación a los 299 TFBSs que se presentaron en los DEGs NEG, ver **Figura 25 (región-TF)**. Los Factores de transcripción más destacados (según el P-valor) asociados a los motivos TFBSs encontrados en los DEGs en CRO 0 vs 6 son: **E2F**, **ZF5** y **E2F-2**. Los Factores de transcripción más destacados (según el P-valor) asociados a los motivos TFBSs encontrados en los DEGs NEG en 0 vs 6 son: **Sp1**, **SP2**, **BETB1**, **BETB2** y **AP2beta**, ver **tabla 5**.



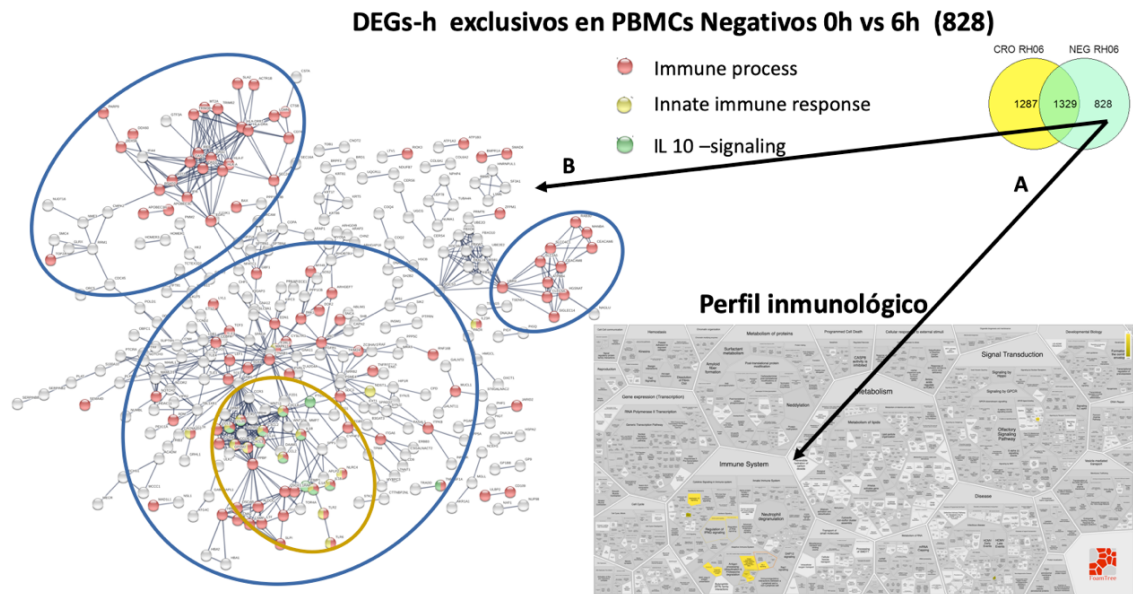
**Figura 25.** Comparación de los perfiles de enriquecimiento funcional de los DEGs de los PBMCs humanos sin infectar (0 horas) versus los mismos PBMCs a la sexta hora post-infección con *T. gondii* (gProfiler). **A:** DEGs exclusivos en PBMCs crónicos. **B:** DEGs exclusivos en PBMCs negativos **C:** DEGs compartidos en ambos grupos de PBMCs. **10:** procesos enriquecidos. **GO:BP**

Ontología de genes : Procesos Biológicos. **GO:MF** Ontología de genes Función molecular. **KEEG**: Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto. **REAC**: Reactoma. **TF (azul)**: Web Server Transfactor para evaluación de motivos de unión a factores de transcripción.



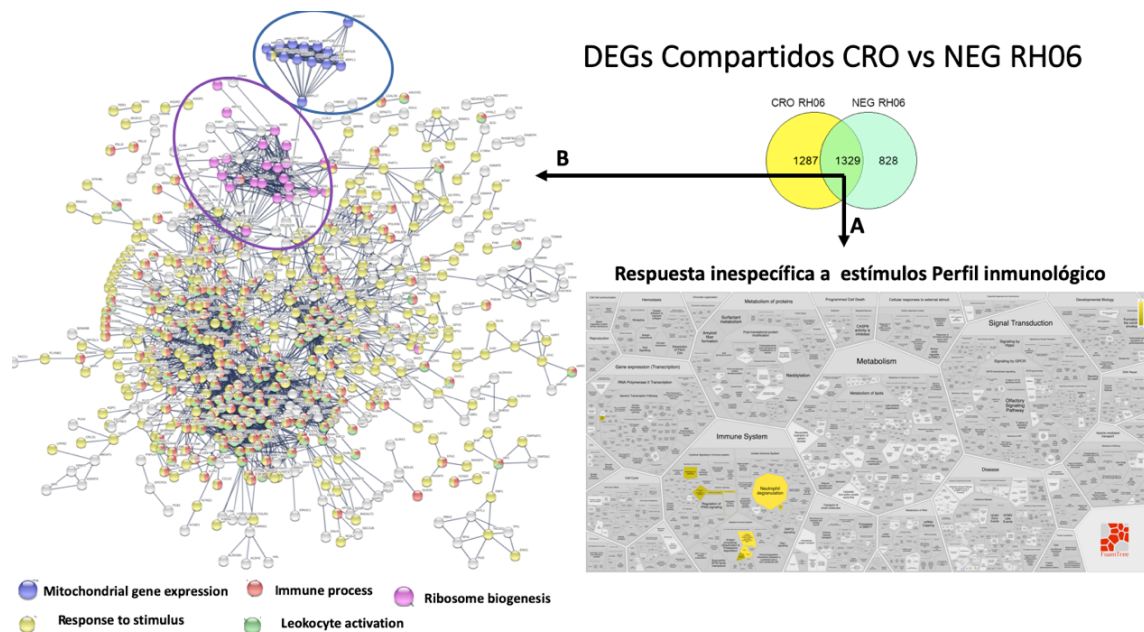
**Figura 26. A. REACTOMA:** Análisis de enriquecimiento funcional de 1287 DEGs humanos exclusivos en los PBMCs Crónicos entre las 0 horas (sin infectar) y las 6 horas post-infección con *T. gondii*. **Immune System:** Sistema inmune. **B. Análisis de enriquecimiento de la interacción Proteína – Proteína** realizada en el servidor **STRING** (índice:0.9) de los (1287) DEGs humanos exclusivos en PBMCs crónicos infectados por *T. gondii*, la comparación ocurre entre las 0 horas (sin infectar) y las 6 horas post-infección.





**Figura 27.** Análisis de enriquecimiento de la interacción Proteína–Proteína realizada en el servidor **STRING** (índice:0.9) de los 828 DEGs humanos exclusivos en PBMCs negativos infectados por *T. gondii*, la comparación ocurre entre las 0 horas (sin infectar) y las 6 horas post-infección. **B. REACTOMA:** Análisis de enriquecimiento funcional de los 828 DEGs humanos exclusivos en los PBMCs Negativos entre las 0 horas (sin infectar) y las 6 horas post-infección con *T. gondii*. **Immune System:** Sistema inmune.





**Figura 28.** Análisis de enriquecimiento de la interacción Proteína–Proteína realizada en el servidor **STRING** (índice:0.9) de los 1329 DEGs compartidos en PBMCs humanos negativos y crónicos para *T. gondii*, la comparación ocurre entre las 0 horas (sin infectar) y las 6 horas post-infección. **B. REACTOMA:** Análisis de enriquecimiento funcional de los 1329 DEGs humanos compartidos entre los PBMCs Crónicos y PBMCs Negativos entre las 0 horas (sin infectar) y las 6 horas post-infección con *T. gondii*. **Immune System:** Sistema inmune.



#### **6.5.3.5 Enriquecimiento funcional de los DEGs sobre expresados (“UP”) y expresados a la baja (“DOWN”) en PBMCs humanos infectados con *T. gondii* en un modelo *ex vivo***

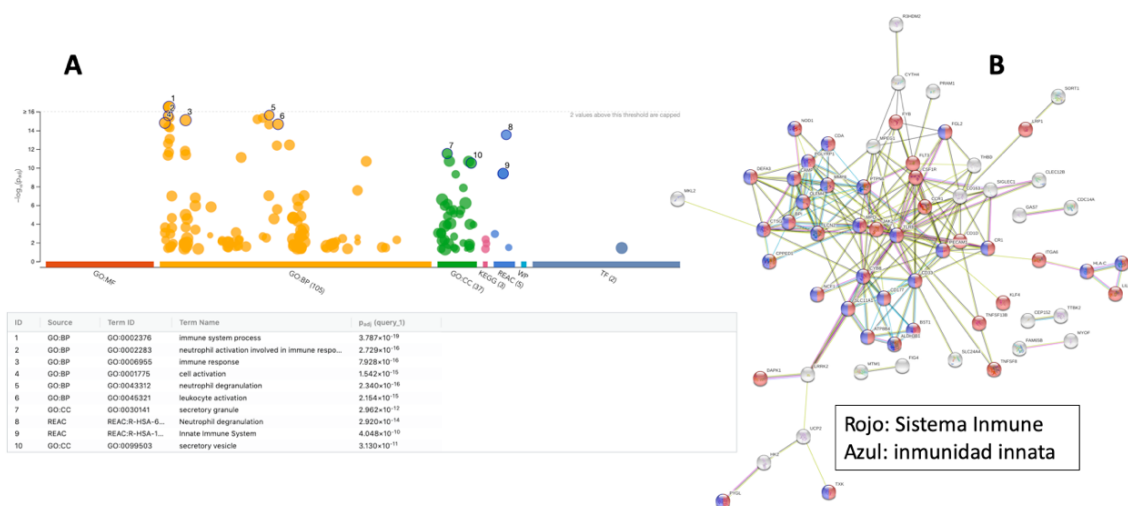
A pesar de haber observado que la respuesta en DEGs es dependiente de la condición IgG+ o IgG- de los PBMCs frente a *Toxoplasma*, conociendo que en cada uno de los tiempos evaluados se comparte un grupo importante de genes y que también se presenta otro grupo de genes exclusivos en cada condición durante la interacción *Toxoplasma*-PBMCs humanos, quisimos establecer si las diferencias y/o coincidencias encontradas en los análisis anteriores podrían estar relacionadas entre ellas o si por el contrario eran dependiente de los DEGs que se estaban “sobre expresando” (UP) o de los que se estaban “expresados a la baja” (DOWN). Escogimos el tiempo 0 vs 1 dado que es el primer momento del que teníamos datos donde se podría observar más rápidamente un efecto de la presencia del parásito en la respuesta a la infección y también evaluamos y analizamos de la misma manera el tiempo 0 vs 6 hpi que es un momento en el que se modela una infección ya establecida.

#### **6.5.3.6 Los procesos inflamatorios están diferenciados de manera opuesta en PBMCs Crónicos respecto a PBMCs Negativos en la interacción inicial (0 vs 1 hpi).**

Los 103 DEGs expresados a la baja (DOWN) en PBMCs crónicos en la primera hora de interacción con *T. gondii* se encuentran relacionados según el enriquecimiento funcional con “activación de leucocitos”, “activación celular”, y respuesta inmune innata, **Figura 29A y 29B**. Los 94 DEGs sobre expresados (UP) en este mismo grupo celular se encuentran relacionados principalmente con respuesta a citoquinas y con un perfil inflamatorio, **Figura 30A y 30B**. De manera contraria a lo encontrado en PBMCs crónicos, los 47 DEGs expresados a la baja en NEG (DOWN) están relacionados principalmente con

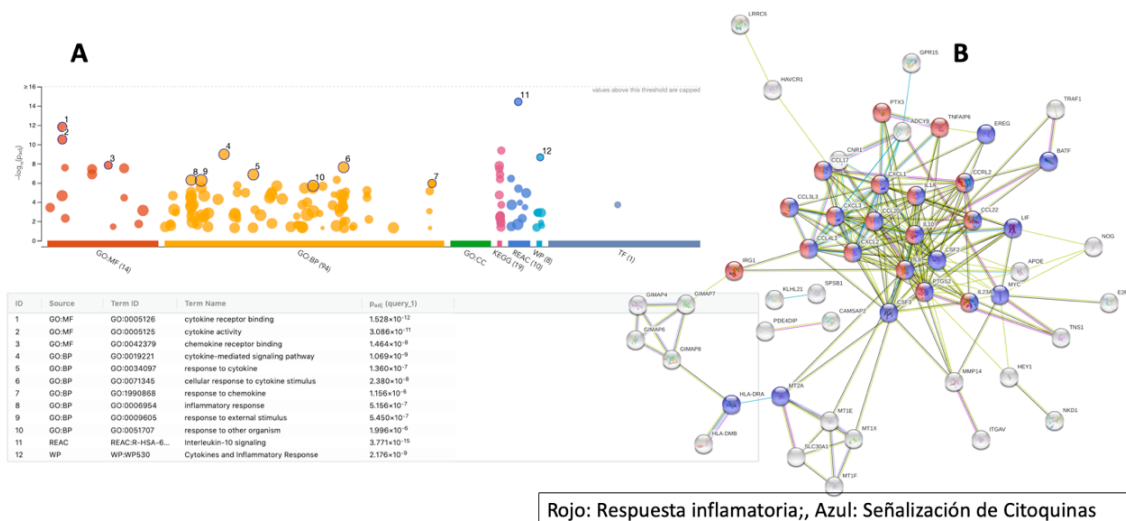
respuesta “mediada por citoquinas” y un perfil inflamatorio, Figura 31A y 31B. En relación con los 74 DEGs sobre expresados en NEG (UP) se encontró que estos genes se encuentran principalmente relacionados con una alteración en “vías de señalización de receptores de superficie” y respuesta a citoquinas, Figura 32A y 32B.

### 103 DEGs “DOWN” CRO/RH/01



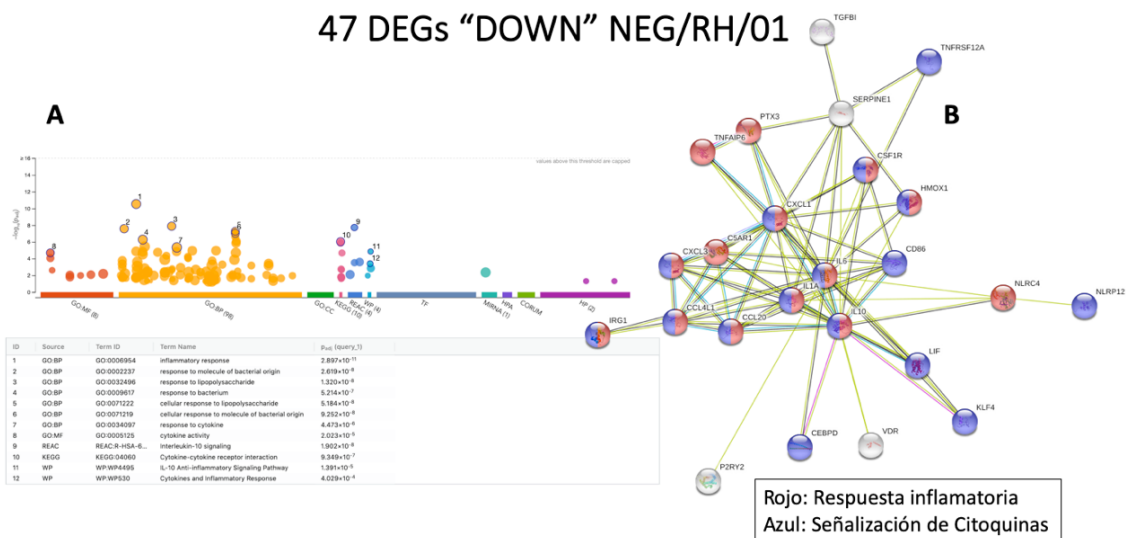
**Figura 29. A.** Análisis de enriquecimiento funcional de los 103 DEGs “DOWN” en los PBMCs Crónicos al comparar las células sin infectar (0 hora) versus la primera de infección por *T. gondii* (gProfiler). 1-10: Principales procesos enriquecidos. **GO:BP** Ontología de genes: Procesos Biológicos. **GO:MF** Ontología de genes Función molecular. **KEEG**: Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto. **REAC**: Reactoma. **TF**: Transfactor web Server para evaluación de motivos de unión a factores de transcripción. **B:** Análisis de enriquecimiento de interacción Proteína–Proteína realizada en el servidor **STRING** (índice:0.9) de los 103 DEGs DOWN en PBMCs humanos crónicos para *T. gondii*, la comparación ocurre entre las 0 horas (sin infectar) y la 1 hora post-infección.

## 94 DEGs “UP” CRO/RH/01



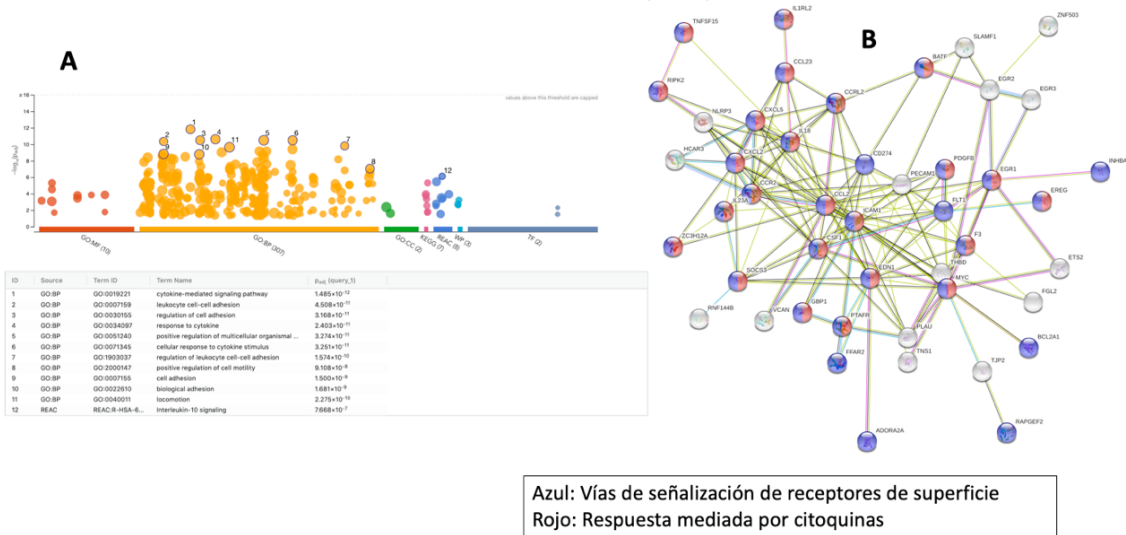
**Figura 30. A:** Análisis de enriquecimiento funcional de los 94 DEGs “UP” en los PBMCs Crónicos al comparar las células sin infectar (0 hora) versus la primera hora de infección por *T. gondii* (gProfiler). **1-10:** Principales procesos enriquecidos. **GO:BP** Ontología de genes: Procesos Biológicos. **GO:MF** Ontología de genes Función molecular. **KEEG:** Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto. **REAC:** Reactoma. **TF:** Web Server Transfactor para evaluación de motivos de unión a factores de transcripción. **B:** Análisis de enriquecimiento de la interacción Proteína–Proteína realizada en el servidor **STRING** (índice:0.7) de los 94 DEGs UP en PBMCs crónicos para *T. gondii*. La comparación ocurre entre las 0 horas (sin infectar) y la 1 hora post-infección.

## 47 DEGs “DOWN” NEG/RH/01



**Figura 31. A:** Análisis de enriquecimiento funcional de los 47 DEGs “DOWN” en los PBMCs Negativos al comparar las células sin infectar (0 hora) versus la primera de infección por *T. gondii* (gProfiler). 1-10: Principales procesos enriquecidos. **GO:BP** Ontología de genes: Procesos Biológicos. **GO:MF** Ontología de genes Función molecular. **KEEG:** Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto. **REAC:** Reactoma. **TF:** Transfactor web Server para evaluación de motivos de unión a factores de transcripción. **B:** Análisis de enriquecimiento de interacción Proteína–Proteína realizada en el servidor **STRING** (índice:0.9) de los 47 DEGs DOWN en PBMCs humanos Negativos para *T. gondii*. La comparación ocurre entre las 0 horas (sin infectar) y la 1 hora post-infección.

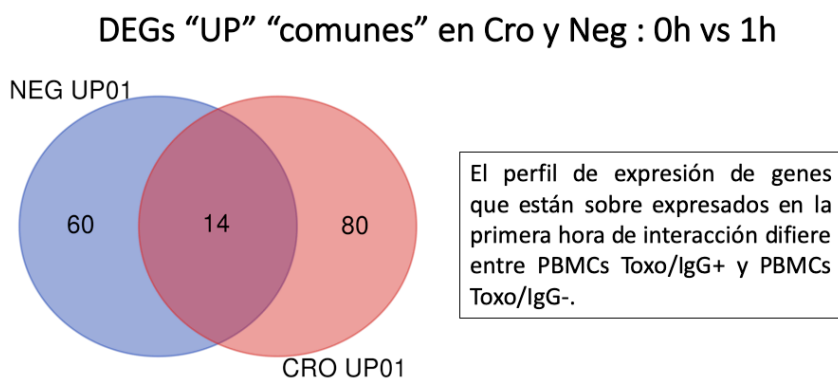
## 74 DEGs “UP” NEG/RH/01



**Figura 32. A:** Análisis de enriquecimiento funcional de los 74 DEGs “UP” en los PBMCs Negativos al comparar las células sin infectar (0 hora) versus la primera de infección por *T. gondii* (gProfiler). **1-10:** Principales procesos enriquecidos. **GO:BP** Ontología de genes: Procesos Biológicos. **GO:MF** Ontología de genes Función molecular. **KEEG:** Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto. **REAC:** Reactoma. **TF:** Web Server Transfactor para evaluación de motivos de unión a factores de transcripción. **B:** Análisis de enriquecimiento de interacción Proteína–Proteína realizada en el servidor **STRING** (índice:0.7) de los 74 DEGs UP en PBMCs Negativos para *T. gondii*. La comparación ocurre entre la 0 hora (sin infectar) y la 1 hora post-infección.

### 6.5.3.7 La respuesta Th17 es el perfil común en los DEGs sobre expresados (UP) en PBMCs CRO y NEG en la primera hora de interacción entre PBMCs y *T. gondii*

Se compararon los DEGS sobre expresados (UP) en los PBMCs crónicos y los DEGs sobre expresados (UP) en los PBMCs negativos frente a la primera hora de interacción con *T. gondii*, con el fin de conocer si existían procesos comunes que se estuvieran activando entre ambos grupos celulares. Un total de 14 DEGs (C11orf96, EREG, KANK1, TNS1, MFSD2A, IL23A, NFKBIZ, NXPE3, MYC, BATF, SAV1, CXCL2, DRAM1, SFR1 y CCRL2) se sobre expresan de manera común entre ambos grupos de PBMCs, **Figura 33** y **tabla 6**. Al realizar el análisis de enriquecimiento funcional de estos 14 DEGs comunes se encontró que están relacionados de manera clara a la diferenciación y respuesta inmune de tipo Th17, **Figura 34A** y **34B**. Un total de 7 DEGs (CEBPD, SIRPB2, CSF1R, ZNF467, TMEM170B, P2RY2, KLF4) se expresan a la baja de manera común entre ambos grupos de PBMCs, **Figura 35** y **tabla 7**. Al realizar el análisis funcional de estos 7 genes no se encontró ningún proceso asociado, **Figura 36A** y **36B**.

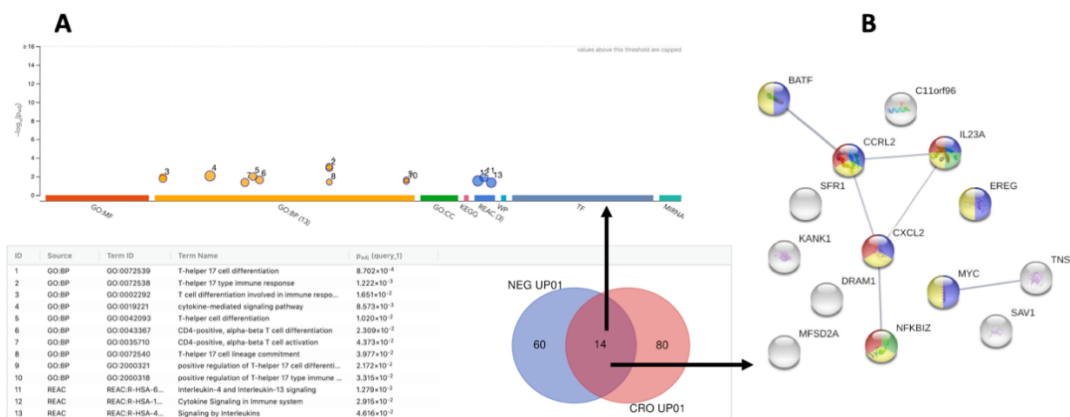


**Figura 33.** Diagramas de Venn de los (DEGs) que se sobre expresan (UP) al comparar PBMCs sin estimular (tiempo 0) versus estimulados a la 1 hora pi, en crónicos y negativos. (Foldchange  $\geq 2$ ). En la intersección del diagrama se observan los 14 DEGs UP comunes.

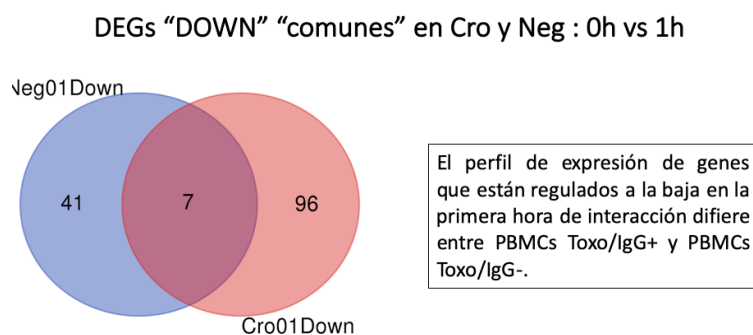


**Tabla 6.** Lista de genes diferencialmente sobre - expresados (UP) en PBMCs humanos al ser infectados con *T. gondii* en un modelo *ex vivo* durante la primera hora de infección. En rojo se resaltan los genes que son comunes en PBMCs negativos y PBMCs crónicos.

GRUPO	Total	elements
<b>CRO UP01 vs NEG UP01</b>	<b>14</b>	<b>C11orf96, EREG, KANK1, TNS1, MFSD2A, IL23A, NFKBIZ,NXPE3, MYC, BATF, SAV1, CXCL2, DRAM1, SFR1, CCRL2</b>
<b>NEG UP01</b>	<b>60</b>	IL1RL2 RIN2 DOK3 CSF1 CD101 EDN1 F3 VCAN FGL2 RASD2 GBP1 MIR146A RNF144B FFAR2 PLAU ITGB8 CCL23 PTAFR RAPGEF2 TNFSF15 FLT1 ZC3H12A G0S2 PECAM1 EGR2 ADORA2A CCR2 PSPHP1 ICAM1 MARCKS SOCS3 ZC3H12C SLAMF1 LOC100128059 PDGFB NLRP3 ETS2 CXCL5 EIF1B LOC100294336 ABL2 INHBA CCL3P1 CD274 EGR3 CYP2S1 LOC107987373 ST3GAL6 CCL2 TRIP10 ZNF503 TJP2 HCAR3 EGR1 RIPK2 HLX BCL2A1 KANSL1 IL18 THBD
<b>CRO UP01</b>	<b>80</b>	DPM2 PDE4DIP KDM7A-DT HOMER1 TNIP3 PSAT1 KCNJ2 GIMAP4 RRAD TNFAIP6 SLC22A1 CCL4L1 CXCL3 CCL3L1 LRRRC6 PTX3 GRB10 MT1F CDCA4 DYRK3 LOC400499 HLA-DRA GIMAP6 FAM71F2 DOCK4 GJB2 IL1A TNFAIP8 SIGLEC12 GEM HLA-DRB3 SYNPO2 CAMSAP2 KLHL21 MT1X NOG MT2A CMSS1 GIMAP8 SLC30A1 LIF SPSB1 HAVCR1 ITGAV BTBD11 HLA-DMB GATM MIR146A,MIR3142HG CCL22 CSF3 GPNMB E2F7 MT1E ADCY9 CXCL1 HSPA6 IL10 CCL20 TRAF1 ACOD1 IL6 PTGS2 MIR155,MIR155HG MMP14 CCL17 CACNA1G ABCA6 NKD1 MIR3945HG LOC105369890 HEY1 LOC105369313 CNR1 PGAP1 GIMAP7 GRK4 GPR15 CSF2 APOE GIMAP1,GIMAP1-GIMAP5,GIMAP5



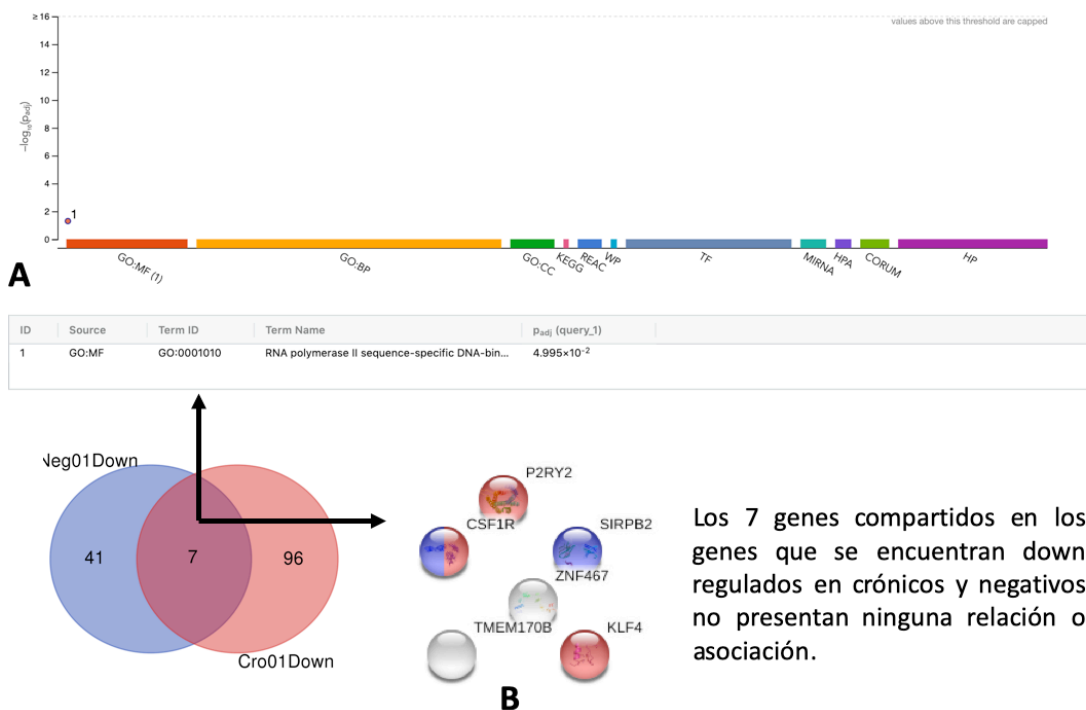
**Figura 34.** Análisis de enriquecimiento funcional de los 14 DEGs “UP” compartidos al comparar las células sin infectar (0 hora) versus la primera hora de infección por *T. gondii* (gProfiler). **1-13:** Principales procesos enriquecidos. **GO:BP** Ontología de genes : Procesos Biológicos. **GO:MF** Ontología de genes Función molecular. **KEEG:** Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto. **REAC:** Reactoma. **TF:** Web Server Transfactor para evaluación de motivos de unión a factores de transcripción. **B:** Análisis de enriquecimiento de interacción Proteína–Proteína realizada en el servidor **STRING** (índice:0.4) de los 14 DEGs UP compartidos en PBMCs crónicos y negativos para *T. gondii*, la comparación ocurre entre la 0 hora (sin infectar) y la 1 hora post-infección.



**Figura 35.** Diagramas de Venn de los (DEGs) que se sobre expresan (DOWN) al comparar PBMCs sin estimular (tiempo 0) versus estimulados a la 1 hora pi, en crónicos y negativos. (Foldchange  $\geq 2$ ). En el medio del diagrama de Venn se observan los (7) DEGs DOWN comunes.

**Tabla 7.** Lista de genes diferencialmente expresados a la baja (DOWN) en PBMCs humanos al ser infectados con *T. gondii* en un modelo *ex vivo* durante la primera hora de infección. En rojo se resaltan los genes que son comunes en PBMCs negativos y PBMCs crónicos.

Names	total	elements
Cro01Down Neg01Down	7	<b>CEBPD, SIRPB2, CSF1R, ZNF467, TMEM170B, P2RY2, KLF4</b>
Neg01Down	41	VDR KCN2 TNIP3 SLC37A2 TNFAIP6 SERPINE1 CCL4L1 CXCL3 PTX3 RGS12 DNAJB5 HMOX1 NLRC4 GJB2 IL1A SIGLEC12 DAGLA DGAT2 KCN15 ARAP3 LIF TGFB1 FAM214B gene AVPI1 CD86 CXCL1 C5AR1 TNFRSF12A IL10 CCL20 CDCP1 ACOD1 IL6 MIR155,MIR155HG CHAC1 LRRC25 DNMBP MIR3945HG INAFM2 NLRP12
Cro01Down	96	LCN2 DEFA3 CAMP FAM111A ARHGAP19,SLIT1 TNFSF13B RIPOR2 GLT1D1 SORT1 FIG4 VCAN CLEC12B FGL2 TRABD2A ALDH3B1 CD163 HRH2 HLA-C CEP85L MYOF CRT3 HK2 MTM1 TNFSF8 ERG PECAM1 ATP8B4 MARCHF1 R3HDM2 GAS7 BPI LOC105370259 SSH2 CD1D PRAM1 IQSEC1 HLA-B MPO CDA LRRK2 Å° TLR8 CCR1 PGLYRP1 NACC2 CYBB MMP8 AK5 CD33 SCIMP SLC24A4 CPPED1 THEMIS2 SLC11A1 CD177 RALGPS2 JAK2 LINC00926 CDC14A MPEG1 DAPK1 RNF144A CTSG PYGL TXK FYB1 LRP1 NOD1 MRTFB OLFM4 NFAM1 TTBK2 TMEM176B LILRA6 CACNA1I NCF1 PTPN6 PLXNB2 RUFY3 HDAC9 BST1 TMEM131L CEP152 CR1 FGD2 ITGA6 UCP2 FLT3 SIGLEC1 CYTH4 ZFP90 MEGF9 THBD LOC101929819 CCDC144A GZF1

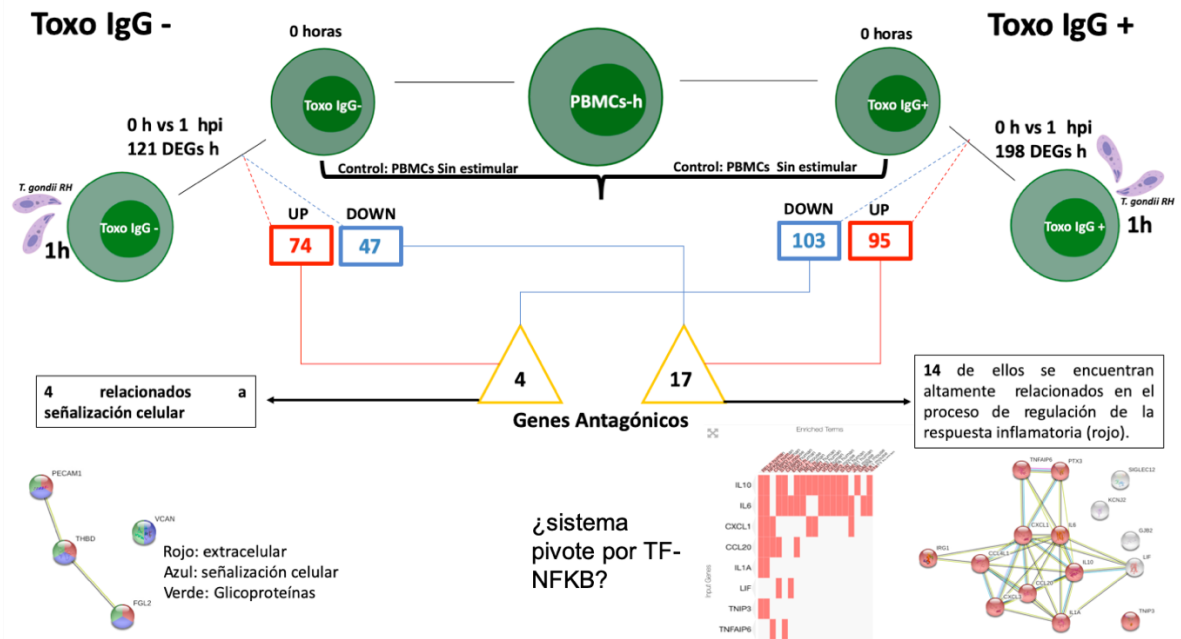


**Figura 36. A:** Análisis de enriquecimiento funcional de los 7 DEGs “DOWN” compartidos entre los PBMCS sin infectar (0 hora) y la primera hora de infección por *T. gondii* (**gProfiler**). **1:** Principales procesos enriquecidos. **GO:BP** Ontología de genes : Procesos Biológicos. **GO:MF** Ontología de genes Función molecular. **KEEG:** Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto. **REAC:** Reactoma. **TF:** Web Server Transfactor para evaluación de motivos de unión a factores de transcripción. **B:** Análisis de enriquecimiento de la interacción Proteína – Proteína realizada en el servidor **STRING** (índice:0.4) de los 7 DEGs DOWN compartidos en PBMCS crónicos y negativos para *T. gondii*, la comparación ocurre entre las 0 hor (sin infectar) y la 1 hora post-infección.

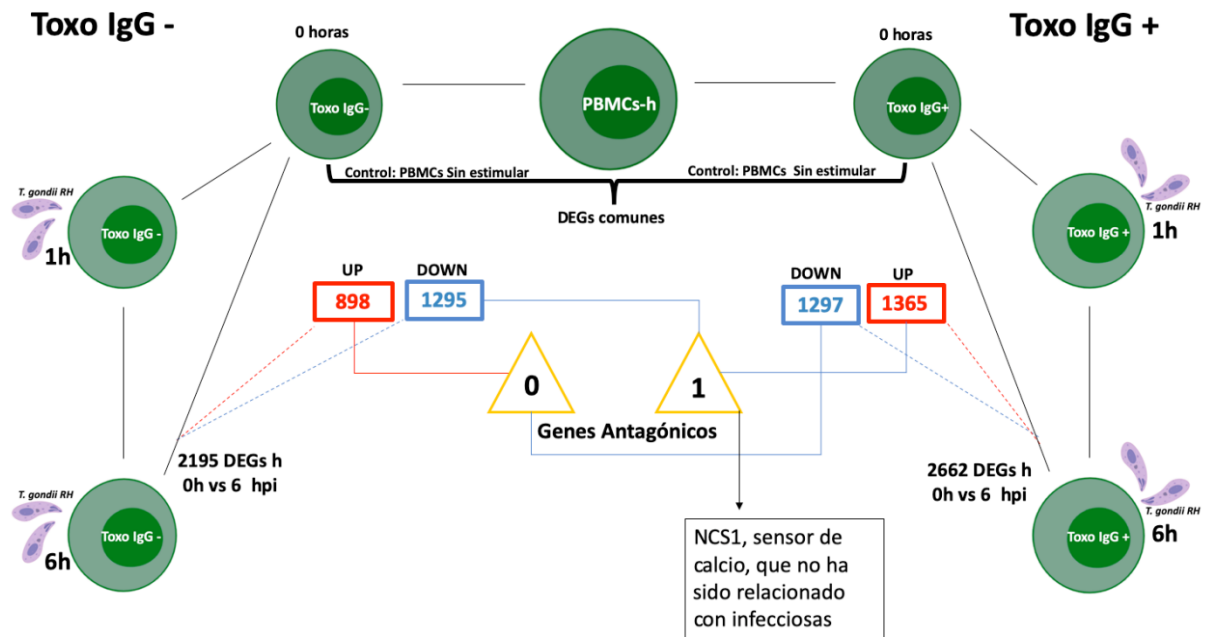
#### 6.5.4 Los DEGs antagónicos son relevantes en la primera hora de la interacción de *T. gondii*-PBMCs-h pero no en la sexta hpi.

El comportamiento antagónico de los genes hace referencia a aquellos genes que bajo las mismas condiciones experimentales (incluido el estímulo) y que tan solo cambiando una variable del experimento puedan presentar de manera opuesta un perfil de expresión diferencial, en este trabajo se evaluó la presencia de estos genes asumiendo el cambio en una variable, la condición CRO (IgG+) o NEG (IgG-) de los PBMCs-h, ver **resumen figura 37**. Bajo esta lógica experimental se evaluó la posibilidad de encontrar un comportamiento antagónico en la interacción entre PBMCs humanos y *T. gondii*, se comparó la primera dinámica de tiempo evaluado en este trabajo (0 vs 1hpi), tomando como base los 94 DEGs sobre expresados de PBMCs crónicos (UP) y se compararon frente a los 47 DEGs expresados a la baja en NEG (DOWN), ver **Figura 39**. Los resultados de esta comparación muestran un total de 17 DEGs que se sobre expresan en la condición CRO y esta expresados a la baja en NEG en la primera hora de interacción con *T. gondii* (TNIP3, KCNJ2, CXCL1, IL10, TNFAIP6, CCL20, CCL4L1, CXCL3, PTX3, ACOD1, IL6, MIR155HG, GJB2, IL1A, MIR3945HG, SIGLEC12 y LIF), ver **Tabla 8**. Posteriormente se realizó el análisis de enriquecimiento de estos 17 DEGs antagónicos y se encontró que al menos 14 de ellos se encuentran muy relacionados en el proceso de regulación de la respuesta inflamatoria, siendo muchas de ellas citoquinas y quimiocinas muy conocidas por participar de manera directa en este proceso biológico, tal como es el caso de la IL10 o la CXCL1, ver **Figura 40**. El mismo tipo de análisis fue realizado, pero con los grupos de DEGs invertidos respecto al descrito anteriormente, se tomaron los 74 DEGs sobre expresados de PBMCs negativos (UP) frente a los 103 DEGs expresados a la baja en CRO (DOWN) en la primera hora de interacción, ver **Figura 41**. Los resultados mostraron solo 4 DEGs antagónicos (VCAN,

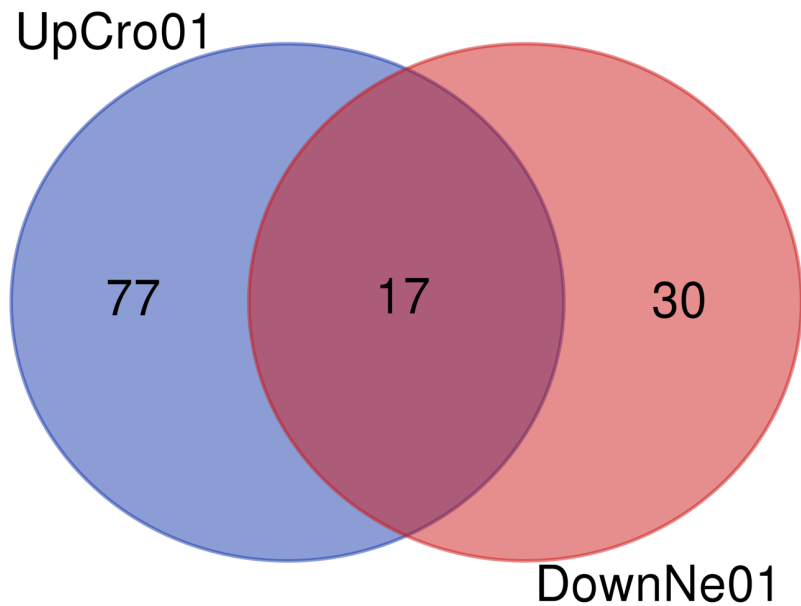
FGL2, PECAM1, THBD), bajo estos parámetros de comparación, ver **Tabla 9**. Al realizar los análisis de enriquecimiento biológico, se encontró que las 4 moléculas son parte de una misma categoría, denominada “moléculas de adhesión” (CAMs), **Figura 42A**, y que además son todas glicoproteínas que participan en “señalización celular”, ver **Figura 42B**. De manera interesante, los mismos análisis realizados en el tiempo 0h vs 6 y solamente arrojaron 1 gen antagonico (NCS1), ver **anexo 14, resumen figura 38**.



**Figura 37.** Resumen del Análisis de RNA-seq de DEGs Antagónicos **0h vs 1 hpi** en PBMCs-humanos infectados con *T. gondii RH* en **MExSs**



**Figura 38.** Resumen del Análisis de RNA-seq DEGs Antagónicos 0h vs 6hpi en PBMCs-h infectados con *T. gondii* RH en *MEexSs*



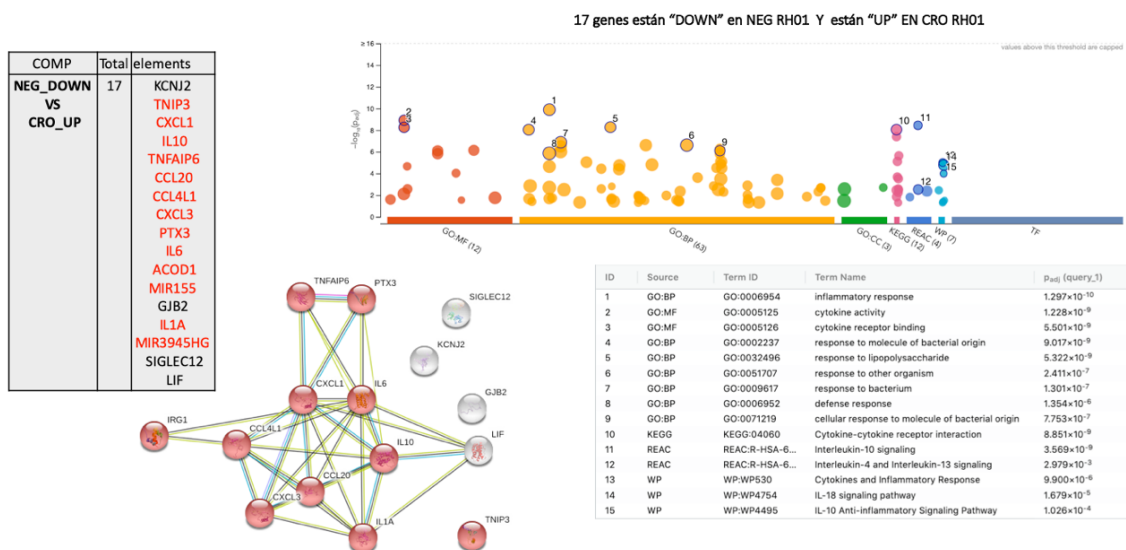
**Figura 39. A:** Diagramas de Venn de los (DEGs) antagónicos (sobre expresados UP en crónicos y expresados a la baja DOWN en negativos) al comparar PBMCs sin estimular (tiempo 0) versus estimulados a la 1 hora pi.

(Foldchange  $\geq 2$ ). En la intersección del diagrama se observan los 17 DEGs antagónicos.

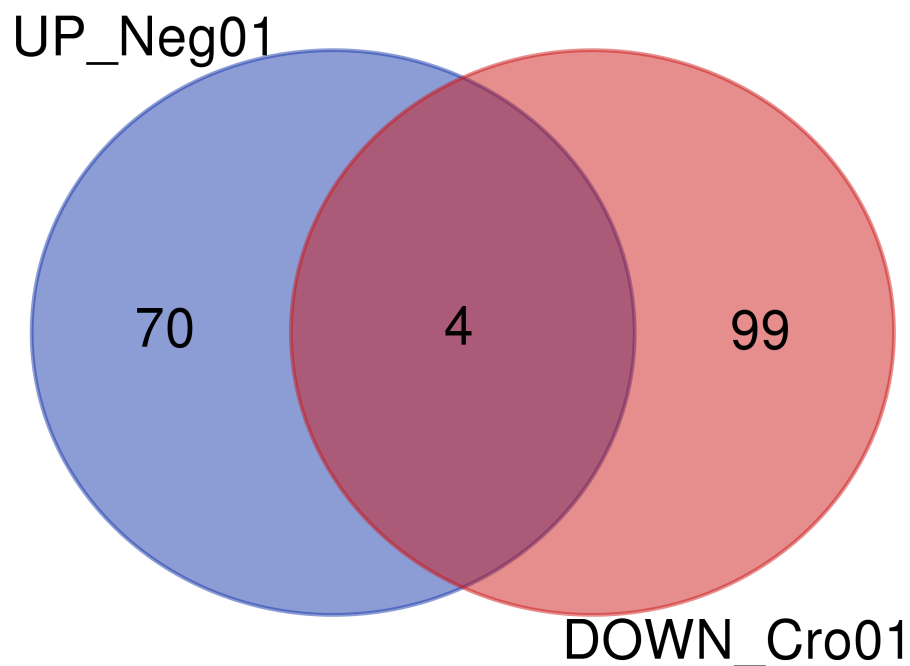
**Tabla 8.** Lista de genes antagónicos 1: (diferencialmente expresados (UP) en Crónicos y expresados a la baja (DOWN) en PBMCs negativos al ser infectados con *T. gondii* en un modelo *ex vivo*, durante la primera hora de infección. En rojo se resaltan los genes que son antagónicos.

Names	total	elements
DownNeg01 UP cro01	17	TNIP3 KCNJ2 CXCL1 IL10 TNFAIP6 CCL20 CCL4L1 CXCL3 PTX3 ACOD1 IL6 MIR155 MIR155HG GJB2 IL1A MIR3945HG SIGLEC12 LIF
UP cro01	77	CCL22 DPM2 PDE4DIP CSF3 GPNMB C11orf96 EREG E2F7 KDM7A-DT MT1E HOMER1 KANK1 PSAT1 GIMAP4 ADCY9 HSPA6 RRAD TNS1 SLC22A1 TRAF1 CCL3L1 LRRC6 GRB10 MT1F PTGS2 CDCA4 MFSD2A DYRK3 MMP14 LOC400499 HLA-DRA BATF GIMAP6 CCL17 SAV1 CACNA1G IL23A CXCL2 ABCA6 FAM71F2 DOCK4 DRAM1 NKD1 NFKBIZ,NXPE3 LOC105369890 TNFAIP8 HEY1 GEM HLA-DRB3 LOC105369313 MYC CNR1 SYNPO2 CAMSAP2 KLHL21 PGAP1 GRK4 GIMAP7 MT1X NOG SFR1 MT2A GPR15 CSF2 GIMAP8 SLC30A1 CMSS1 APOE CCRL2 GIMAP1,GIMAP1- GIMAP5,GIMAP5 SPSB1 HAVCR1 ITGAV BTBD11 HLA-DMB MIR146A,MIR3142HG GATM
DownNeg01	31	VDR ZNF467 gene AVPI1 CD86 SLC37A2 C5AR1 TNFRSF12A SERPINE1 RGS12 DNAJB5 CEBPD HMOX1 CDCP1 TMEM170B SIRPB2 NLRC4 P2RY2 CHAC1 LRRC25 DNMBP INAFM2 DAGLA DGAT2 CSF1R KCNJ15 ARAP3 TGFBI KLF4 FAM214B NLRP12





**Figura 40.** Análisis de enriquecimiento funcional de los (DEGs) antagónicos (sobre expresados UP en crónicos y expresados a la baja DOWN en negativos) al comparar PBMCs sin estimular (tiempo 0) versus estimulados a la 1 hora pi (**gProfiler**). **1-15:** Principales procesos enriquecidos. **GO:BP** Ontología de genes: Procesos Biológicos. **GO:MF** Ontología de genes Función molecular. **KEEG:** Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto. **REAC:** Reactoma. **TF:** Web Server Transfactor para evaluación de motivos de unión a factores de transcripción. **B:** Análisis de enriquecimiento de la interacción Proteína – Proteína realizada en el servidor **STRING** (índice:0.4, azul y violeta: evidencia experimental, verde, roja y azul cian: interacción predictiva, amarillo, azul oscuro y negro: otras interacciones) de los (17) DEGs antagónicos.

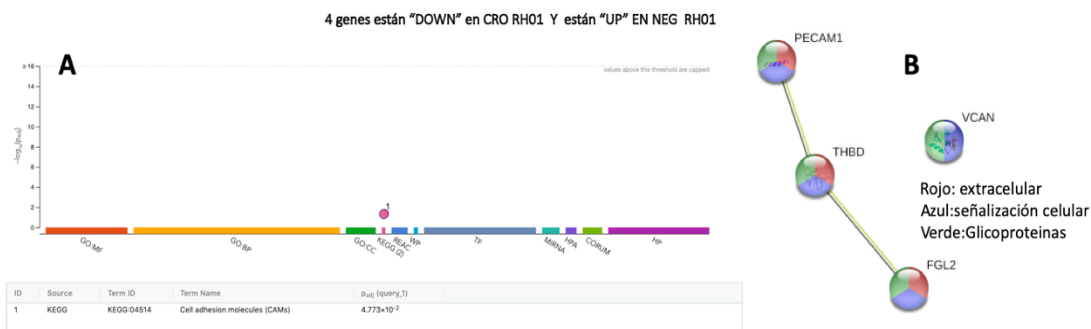


**Figura 41.** Diagramas de Venn de los (DEGs) antagónicos (sobre expresados UP en PBMCs negativos y expresados a la baja DOWN en Crónicos) al comparar PBMCs sin estimular (tiempo 0) versus estimulados a la 1 hora pi. (Foldchange  $\geq 2$ ). En la intersección del diagrama se observan los 4 DEGs antagónicos.

**Tabla 9.** Lista de genes antagónicos diferencialmente expresados UP en Negativos y expresados a la baja DOWN en PBMCs Crónicos al ser infectados con *T. gondii* en un modelo *ex vivo*, durante la primera hora de infección. En rojo se resaltan los genes que son antagónicos.

Names	Total	elements
DOWN_CRO_01 vs UP_NEG_01	4	VCAN FGL2 PECAM1 THBD

UP_NEG_01	70	IL1RL2 C11orf96 EREG RIN2 KANK1 DOK3 CSF1 CD101 EDN1 F3 TNS1 RASD2 GBP1 MIR146A RNF144B FFAR2 PLAU ITGB8 CCL23 PTAFR RAPGEF2 TNFSF15 FLT1 ZC3H12A MFSD2A G0S2 IL23A EGR2 ADORA2A NFKBIZ, NXPE3 CCR2 PSPHP1 ICAM1 MYC MARCKS SOCS3 ZC3H12C SLAMF1 LOC100128059 PDGFB NLRP3 ETS2 CXCL5 EIF1B LOC100294336 ABL2 INHBA CCL3P1 CD274 EGR3 CYP2S1 LOC107987373 ST3GAL6 CCL2 TRIP10 ZNF503 TJP2 HCAR3 BATF EGR1 SAV1 RIPK2 CXCL2 DRAM1 HLX BCL2A1 KANSL1 IL18 SFR1 CCRL2
DOWN_NEG_01	99	LCN2 DEFA3 CAMP FAM111A ARHGAP19,SLIT1 TNFSF13B RIPOR2 GLT1D1 SORT1 FIG4 CLEC12B TRABD2A ALDH3B1 CD163 HRH2 HLA-C CEBPD CEP85L SIRPB2 MYOF CRT3 HK2 MTM1 TNFSF8 ERG ATP8B4 MARCHF1 R3HDM2 GAS7 BPI LOC105370259 SSH2 CSF1R CD1D PRAM1 IQSEC1 HLA-B MPO CDA LRRK2 $\hat{\text{A}}^{\circ}$ TLR8 CCR1 PGLYRP1 NACC2 ZNF467 CYBB MMP8 AK5 CD33 SCIMP SLC24A4 CPPED1 THEMIS2 SLC11A1 RALGPS2 CD177 JAK2 LINC00926 CDC14A MPEP1 DAPK1 RNF144A PYGL CTSG TXK FYB1 LRP1 MRTFB NOD1 OLFM4 NFAM1 TMEM170B TTBK2 TMEM176B LILRA6 CACNA1I NCF1 PTPN6 PLXNB2 RUFY3 P2RY2 HDAC9 BST1 TMEM131L CEP152 CR1 FGD2 ITGA6 UCP2 FLT3 SIGLEC1 CYTH4 ZFP90 MEGF9 LOC101929819 KLF4 GZF1 CCDC144A

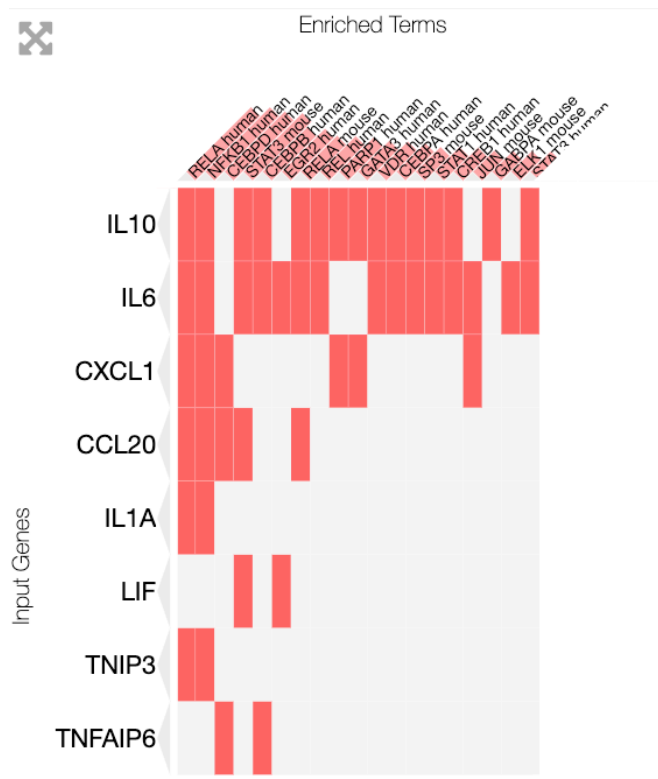


**Figura 42.** Análisis de enriquecimiento funcional de los (DEGs) antagónicos (sobre expresados UP en negativos y expresados a la baja DOWN en Crónicos) al comparar PBMCs sin estimular (tiempo 0) versus estimulados a la 1 hora pi (**gProfiler**). **1:** Principales procesos enriquecidos. **GO:BP** Ontología de genes: Procesos Biológicos. **GO:MF** Ontología de genes Función molecular. **KEEG:** Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto. **REAC:** Reactoma. **TF:** Web Server Transfactor para evaluación de motivos de unión a factores de transcripción. **B:** Análisis de enriquecimiento de la interacción Proteína – Proteína realizada en el servidor **STRING** (índice:0.4, azul y violeta: evidencia experimental, verde, roja y azul cian: interacción predictiva, amarillo, azul oscuro y negro: otras interacciones) de los (4) DEGs antagónicos.

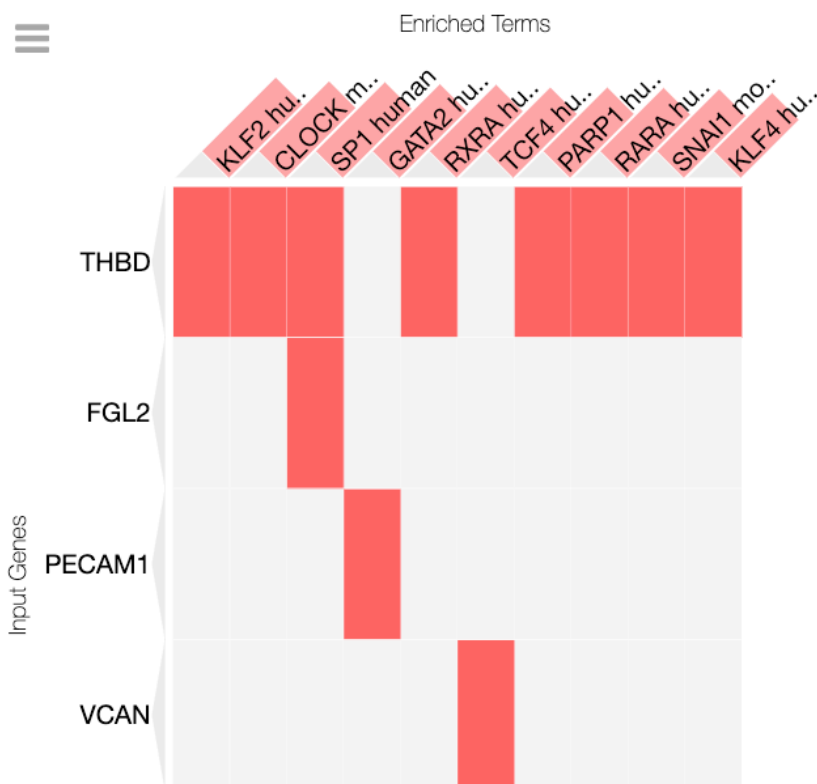
#### **6.5.5 El factor de transcripción *NFKB* humano se presenta como el factor de transcripción con mayor relación a la respuesta diferenciada en la primera hora de interacción entre PBMCs humanos y *T. gondii* en condiciones *ex vivo*.**

Una vez establecido los DEGs antagónicos en cada uno de los grupos de PBMCs humanos al ser infectados por *T. gondii* en la primera hora de interacción, se quiso evaluar la posibilidad de que estos genes antagónicos tuvieran alguna relación con la presencia de factores de transcripción asociados a su comportamiento de sobre expresión o de expresión a la baja. Los análisis de enriquecimiento asociados a factores de transcripción evidenciaron que en el caso de los 17 DEGs antagónicos UP en CRO y DOWN en NEG 6 de estos genes (TNIP3, CXCL1, IL10, CCL20, IL6, IL1A) tienen en común que son regulados por los factores de transcripción NKFB1 y RELA, ver **Figura 43**. Estos dos factores de transcripción son importantes precursores del factor de transcripción NFKB, el cual también de manera interesante se presentó sobre expresado en CRO y no en NEG en el tiempo 0 vs 1 hpi. Por otra parte, en el enriquecimiento asociados a factores de transcripción en los 4 DEGs antagónicos UP en NEG, DOWN en CRO,

mostraron una asociación de dos genes (THBD y FGL2) con el factor de transcripción Sp1, ver **Figura 44**.



**Figura 43.** Análisis de enriquecimiento de factores de transcripción de los 17 DEGs antagónicos (UP en CRO y DOWN en NEG) presentes en la primera hora de interacción entre *T. gondii* y PBMCs humanos. **Input Genes:** Lista de genes antagónicos. **Enrich Terms:** Factores de transcripción asociados a los genes antagónicos.

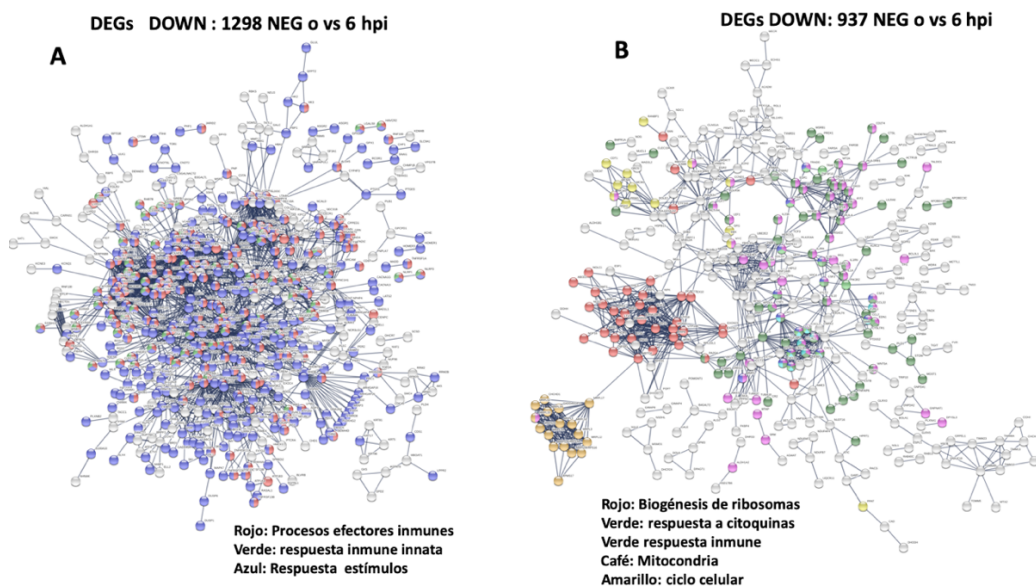


**Figura 44.** Análisis de enriquecimiento de factores de transcripción de los 4 DEGs antagónicos (UP en NEG y DOWN en CRO) presentes en la primera hora de interacción entre *T. gondii* y PBMCs humanos. **Input Genes:** Lista de genes antagónicos. **Enrich Terms:** Factores de transcripción asociados a los genes antagónicos.

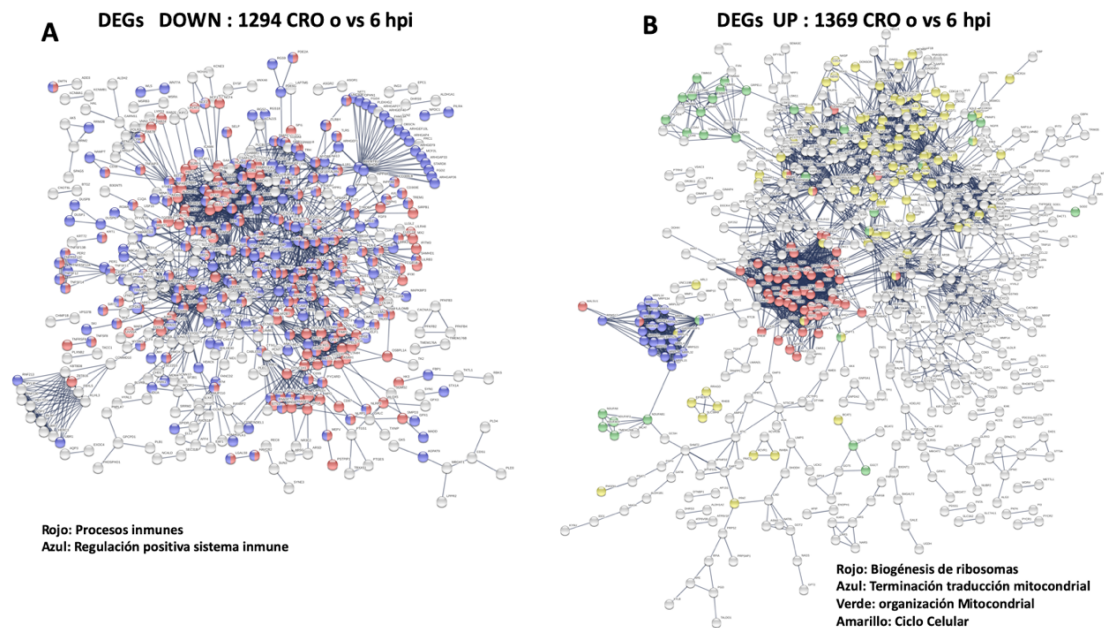
#### 6.5.6 El ciclo celular es la categoría con más diferencias en la sexta hora de interacción entre *T. gondii* y los PBMCs humanos, la biogénesis de ribosomas y una alta actividad mitocondrial son perfiles dominantes comunes en esta dinámica de comparación

Los análisis de enriquecimiento biológico de todo el set completo de genes diferencialmente expresados tanto de DEGs DOWN y DEGs UP fue llevado a cabo para evidenciar los procesos biológicos más enriquecidos en la sexta hora de interacción entre *T. gondii* y los PBMCs humanos. Respecto a los

DEGs expresados DOWN (1294 en CRO y 1928 en NEG) los análisis de enriquecimiento muestran que en NEG sigue presentándose categorías más generalizadas tales como “respuesta a estímulos externos y respuesta inmune innata”, ver **Figura 45A**. Por otro lado, en CRO los DEGs DOWN están relacionados con “sistema inmune” pero principalmente con procesos de “regulación inmunológica”, ver **Figura 45A**. En cuanto a los resultados relacionados a los DEGs sobre expresados (UP), se observó que tanto para NEG como para CRO se presentaron unos perfiles dominantes UP similares en relación a las categorías de “Biogénesis de ribosomas” y “actividad mitocondrial”, ver **Figura 46B y 46B**.



**Figura 45.** Análisis de enriquecimiento de interacción Proteína–Proteína realizada en el servidor **STRING** (índice:0.9) de los 937 DEGs UP en NEG y los 1298 DEGs DOWN en NEG comparando la 0 y 6 hpi.



**Figura 46.** Análisis de enriquecimiento de interacción Proteína–Proteína realizada en el servidor **STRING** (índice:0.9) de los 1369 DEGs UP en CRO y los 1294 DOWN en CRO comparando la 0 y 6 hpi.

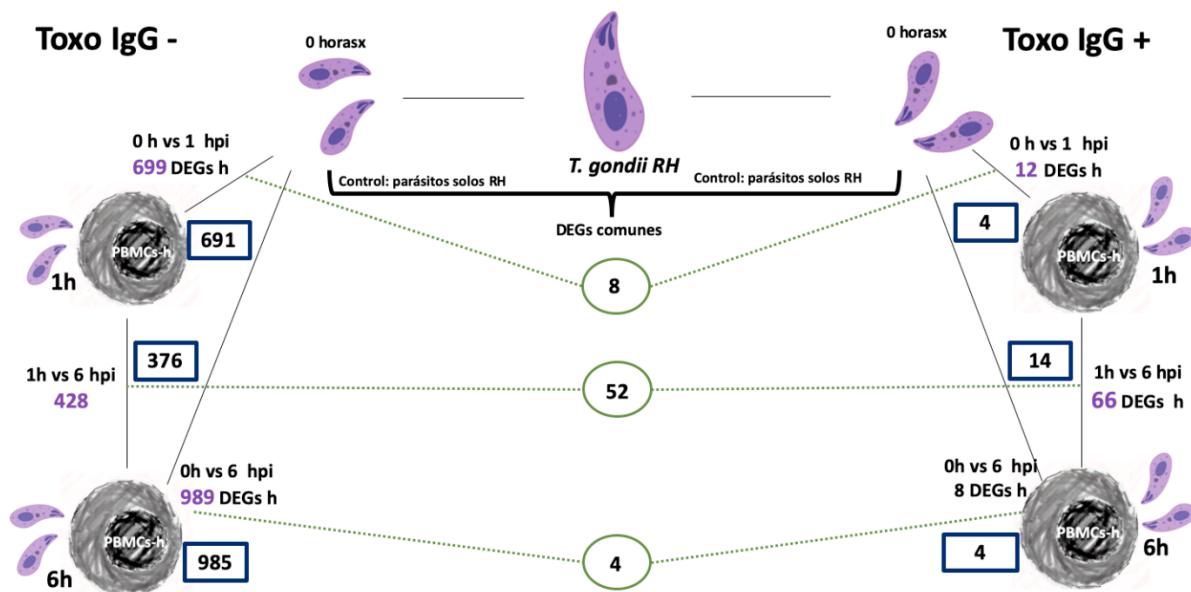
## 6.6. Aspectos generales de los genes diferencialmente expresados en *Toxoplasma gondii* en la interacción con PBMCs-h en un modelo *ex vivo*

### 6.6.1. *Toxoplasma gondii* RH presenta perfiles de expresión totalmente diferenciados y dependientes del tipo celular (Toxo- IgG+/CRO/ o Toxo IgG- /NEG) en la interacción con PBMCs-h en un modelo *ex vivo*

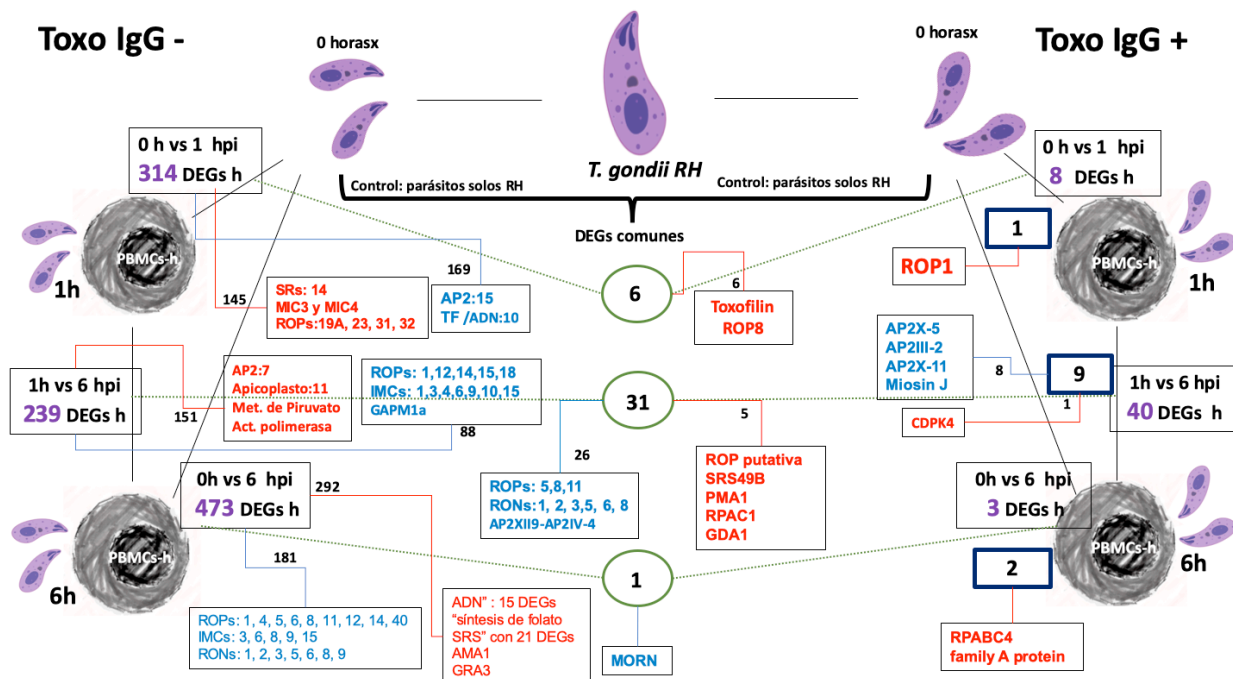
Para el caso de los DEGs presentes en *Toxoplasma gondii* presentamos unas figuras integradoras que son un resumen del total de DEGs presentes en cada condición y cada tiempo (**Figura 47**) y los DEGs resultantes después de excluir las proteínas hipotéticas del parásito y mostrando que el perfil de expresión de genes de *T. gondii* es dependiente de la condición IgG+/- de los PBMC-h en el modelo (**Figura 48**). Estos datos son detallados en los siguientes apartados en relación al parásito.



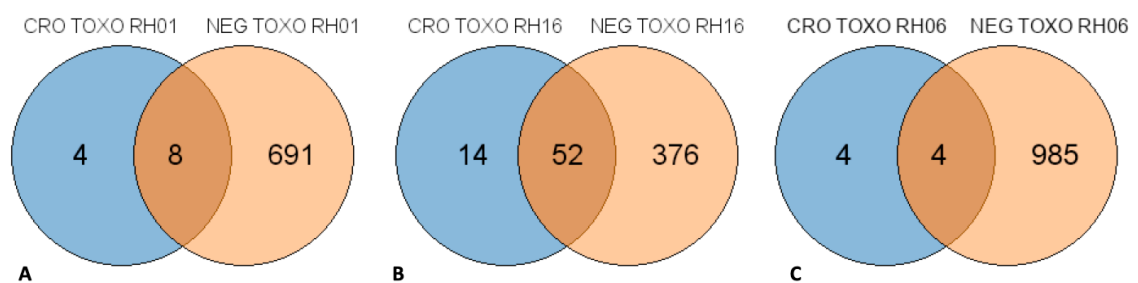
**Figura 47.** Resumen del Análisis de RNA-seq, DEGs de *T. gondii* RH al infectar PBMCs-h



**Figura 48.** El perfil de expresión de genes de *T. gondii* es dependiente de la condición IgG+/- de los PBMC-h en el modelo *MEexSs*



Tomando como primer punto de comparación el número de total de genes diferencialmente expresados (DEGs) por parte de *Toxoplasma gondii* RH al interactuar con PBMCs-h, se observó dos escenarios radicalmente diferentes. En la primera hora de interacción se presentaron solo 12 genes diferencialmente expresados por parte de *T. gondii* al interactuar con PBMCs-h toxo-IgG+(CRO), numero excesivamente bajo si lo comparamos con los 699 genes diferencialmente expresados al interactuar con PBMCs toxo-IgG-(NEG), ver **Figura 49 A**. El fenómeno de pocos DEGs en CRO vs cientos de DEGs en NEG se repitió al comparar tanto el tiempo 1 vs 6 hpi (CRO: 66 DEGs vs NEG: 428 DEGs), ver **Figura 49 B**, como al comparar el tiempo 0 vs 6 (CRO: 8 DEGs vs NEG: 989 DEGs), ver **Figura 49 C**. Debido a esta particular diferencia, presentaré los resultados en dos apartados, el primero de ellos será relacionado solo a los enriquecimientos (cuando fue posible) de los pocos DEGS en PBMCs CRO, y en un segundo apartado presentare los resultados de los cientos de DEGs que se presentaron en *T. gondii* al interactuar con PBMCs-h NEG.



**Figura 49:** Diagramas de Venn de los genes diferencialmente expresados (DEGs) en *T. gondii* en la interacción con PBMCs-h en condiciones *ex vivo*. **A:** Comparación de los DEGs de individuos Crónicos vs negativos, estimulados a la 1 hora vs 0 hpi. **B:** Comparación de los DEGs de individuos Crónicos vs

negativos, estimulados a las 6 horas vs 1 hpi. **C**: Comparación de los DEGs de individuos Crónicos vs negativos, estimulados a las 6 horas vs 0 hpi.

### **6.6.2 Las proteínas hipotéticas representan un alto número de DEGs presentes en *T. gondii* en la interacción *ex vivo* con PBMCs-h y muchas de ellas son potencialmente secretadas por el parásito**

Al analizar los DEGs presentes en *T. gondii* RH en el modelo *ex vivo* de interacción con PBMCs-h, se encontró que en todas las condiciones donde se presentaron DEGs, un alto número de ellos, entre el 32% hasta el 67% corresponden a “proteínas hipotéticas”, ver **Tabla 10, anexo 16**. Sin embargo, el registro de tan alto número de DEGs hipotéticas es sumamente relevante en los análisis de expresión de genes en *Toxoplasma*, pues estamos evidenciando que en los estudios de la interacción hospedero parásito podrían estar dejando de lado en algunas ocasiones hasta más de la mitad de los genes que está potencialmente utilizando el parásito en la interacción hospedero-humano, pues de estos DEGs no tenemos casi ningún tipo de información funcional. Lo anterior limita de manera considerable el análisis de enriquecimiento funcional y en consecuencia estas proteínas hipotéticas fueron eliminadas de las listas en los análisis de enriquecimiento posteriores. A pesar de desconocer las funciones de las proteínas hipotéticas, en un pequeño análisis de enriquecimiento sobre estos DEGs “hipotéticos” se encontró que un porcentaje importante (superior al 20% en casi todos los casos) de las proteínas hipotéticas presentan la característica de péptido señal, sugiriendo que muchas de ellas son potencialmente secretadas por el parásito, **Tabla 10**.

**Tabla 10.** Análisis de presencia de “proteínas hipotéticas” y presencia de péptido señal en la interacción *ex vivo* de *Toxoplasma* y PBMCs-h.

**Presencia de una alta proporción de proteínas “hipotéticas” y con péptido señal en los DEGs de *Toxoplasma gondii***

Comparaciones	TOTAL DEGs	Hipotéticas	% hyp	% péptido señal en hyp
diff_cro-RH01_DE_down	1	0	0.00	0
diff_cro-RH01_DE_up	11	4	36	25
diff_cro-RH06_DE_down	2	1	50	0
diff_cro-RH06_DE_up	6	4	67	25
diff_cro-RH16_DE_down	57	23	43	18
diff_cro-RH16_DE_up	9	3	33	33
diff_neg-RH01_DE_down	392	222	57	20
diff_neg-RH01_DE_up	308	163	52	32
diff_neg-RH06_DE_down	482	301	62	22
diff_neg-RH06_DE_up	504	212	42	20
diff_neg-RH16_DE_down	187	99	52	25
diff_neg-RH16_DE_up	240	90	38	20

**6.6.3 En el modelo *ex vivo* no se evidencian “hot spots” de infección en *T. gondii* al interactuar con PBMCs-h**

Con el fin de determinar si existían regiones cromosómicas ricas en genes (“hot spots”) relacionados con la respuesta a la infección de *T. gondii* a células humanas en el modelo de infección *ex vivo*, se evaluó la distribución cromosómica de cada uno de los DEGs presentados por *T. gondii* en cada uno

de los tiempos analizados. Se encontró que los DEGs de *Toxoplasma* se encuentran distribuidos a lo largo de todos los cromosomas y no fueron detectados “hot spots” en ninguno de los tiempos ni condiciones evaluadas en nuestro modelo de infección *ex vivo*. **Anexo 17.**

## 6. 7. DEGs de *Toxoplasma gondii* en PBMCs-h crónicos

### O h vs 1 hpi

#### 6.7.1. Rop8, Rop1 y Toxofilin son los principales DEGs sobre expresados por *T. gondii* en la interacción con PBMCs-h CRO en condiciones *ex vivo* en la primera hpi

Dentro de los pocos DEGs (11) que *Toxoplasma* sobre-expresó (UP) en la primera hora de interacción con PBMCs-h CRO, ver **tabla 11**, no se encontró asociado ningún proceso particularmente enriquecido, sin embargo, al analizar uno a uno los DEGs presentados en esta condición, se puede resaltar la presencia de algunos genes muy estudiados en relación a los primeros estadios del proceso de invasión, tales como Rop1, Rop8 y Toxofilina. En cuanto a genes expresados a la baja (DOWN) no se presentó ningún gen diferencialmente expresado en la primera hora de interacción de *T. gondii* con PBMCs-h crónicos.

**Tabla 11.** DEGs de *Toxoplasma gondii* RH sobre-expresados en la primera hora de interacción en PBMCs-h crónicos.

<b>DEGs sobre expresados por el parasito en 0 vs 1 en CRO</b>		
gene	log2(fold_change)	Product Description
TGGT1_411470	1.46095	putative transmembrane protein

TGGT1_356400	2.51252	cAMP-dependent protein kinase
TGGT1_209985	1.97755	cAMP-dependent protein kinase
TGGT1_214080	2.12247	<b>toxofilin</b>
TGGT1_215775	1.88209	<b>rhopty protein ROP8</b>
TGGT1_309590	1.83907	<b>rhopty protein ROP1</b>
TGGT1_249150	2.3997	PAN domain-containing protein

### 1 h vs 6 hpi

#### 6.7.2. Pocos cambios son observados en el perfil de genes sobre-expresados en *T. gondii* entre la primera y la sexta hora de interacción con PBMCs-h crónicos

En la dinámica de expresión entre la hora 1 y la hora 6 de la interacción entre *T. gondii* y PBMCs-h crónicos se evidenciaron solo 6 DEGs (PMA1, Rhopty kinase family protein, CDPK4, RPAC1, GDA1 y SRS49B) por parte de *Toxoplasma*, ver **tabla 12**. En los análisis de enriquecimiento no se encontró ningún proceso relacionado a estos DEGs. Al analizar uno a uno los genes encontramos que hay 3 moléculas (PMA1, GDA1 y CDPK4) que han sido relacionados al proceso de invasión, cambio de estadio y proliferación en *T. gondii*.

**Tabla 12.** DEGs de *T. gondii* sobre expresados (UP) en la interacción con PBMCs-h crónicos en un modelo *ex vivo*.

gene	log2(fold_change)	Product Description
TGGT1_252640	2.18205	P-type ATPase PMA1
TGGT1_253330	2.61555	Rhoptry kinase family protein
TGGT1_237890	1.86099	calcium-dependent protein kinase CDPK4
TGGT1_267390	1.7964	DNA-directed RNA polymerase I RPAC1
TGGT1_225290	2.01217	GDA1/CD39 (nucleoside phosphatase) family protein
TGGT1_207140	3.15014	SAG-related sequence SRS49B

### 6.7.3. Proteínas provenientes del complejo apical son reguladas a la baja entre la primera y la sexta hora de interacción de *T. gondii* con PBMCs-h crónicos

Se encontraron 34 DEGs en *T. gondii* entre la primera y la sexta hora de interacción *ex vivo* con PBMCs-h crónicos, ver **anexo 18**. En relación con el enriquecimiento de estos 34 genes, se evidenció que principalmente son moléculas provenientes del complejo apical, muchas de ellas relacionadas al proceso de invasión del parásito, entre las que se destacan varias proteínas RON (RON 1, RON2, RON 5 y RON6) y varias de la familia de las proteínas roptrías (ROP4, ROP5, ROP6, ROP7, ROP8, ROP11 y ROP40). También se encontró un enriquecimiento relacionado a un grupo de proteínas (AP2X11, AP2X5, AP2XII-9, AP2III-2 y AP2IV-4, ver **Tabla 13**, de una familia conocida como AP2, proteínas muy importantes para la regulación de la expresión génica en *Toxoplasma*.

**Tabla 13.** Principales proteínas asociadas a los DEGs expresados a la baja (DOWN) en *T. gondii* entre la primera y la sexta hora de interacción con PBMCs-h crónicos.

Family proteins	gene	log2(fold_change)	Product Description
Reguladores AP2	TGGT1_253380	-2.01461	AP2 domain transcription factor AP2III-2
	TGGT1_318470	-2.79346	AP2 domain transcription factor AP2IV-4
	TGGT1_237090	-1.78529	AP2 domain transcription factor AP2X-5
	TGGT1_215570	-1.5687	AP2 domain transcription factor AP2X-11
	TGGT1_251740	-1.86165	AP2 domain transcription factor AP2XII-9
ROPs	TGGT1_363030	-2.12502	roptry protein ROP8
	TGGT1_295110	-2.12262	roptry protein ROP7
	TGGT1_411430	-2.021	roptry protein ROP5
	TGGT1_291960	-2.21086	roptry kinase family protein ROP40 (incomplete catalytic triad)
	TGGT1_295125	-2.35018	roptry protein ROP4
	TGGT1_258660	-1.7912	roptry protein ROP6
	TGGT1_227810	-1.92977	roptry kinase family protein ROP11 (incomplete catalytic triad)
	TGGT1_215775	-2.11065	roptry protein ROP8
RONs	TGGT1_297960B	-2.19935	roptry neck protein RON6
	TGGT1_297960A	-2.33013	roptry neck protein RON6
	TGGT1_306060	-2.09957	roptry neck protein RON8
	TGGT1_223920	-2.46854	roptry neck protein RON3
	TGGT1_310010	-1.54797	roptry neck protein RON1
	TGGT1_311470	-2.05484	roptry neck protein RON5
	TGGT1_300100	-2.44042	roptry neck protein RON2

## 0 h vs 6 hpi

### 6.7.4. Un escenario sorprendentemente inalterado en los DEGs de *Toxoplasma* es el resultado de la comparación entre la hora 0 y 6hpi en la interacción con PBMCs-h crónicos

La técnica de RNA-seq a través del número de DEGs presentes en cada interacción puede explicar de cierta manera la posible afectación de los estímulos en la interacción entre *Toxoplasma* y las células PBMCs. Sin embargo al analizar los DEGs de *Toxoplasma* en la dinámica de comparación de la hora 0 frente a la hora 6 de interacción con PBMCs-h crónicos el resultado es sorprendente, pues tan solo se presentaron 8 DEGs entre los cuales existían 5 hipotéticas, que al eliminarlos del análisis, nos dejó como



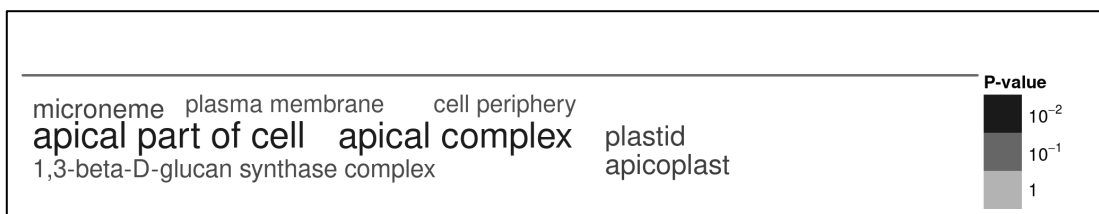
resultado tan solo 3 DEGs: “1 en DOWN”: MORN que pertenece a una familia de proteínas asociadas a la gemación de las células hijas de toxoplasma; y “2 en UP”: *Toxoplasma gondii* family A protein y RPABC4, la primera sin ninguna función descrita y la segunda una proteína inductora de transcripción de DNA a RNA.

## **6.8. DEGs de *Toxoplasma gondii* en PBMCs-h negativos**

### **O h vs 1 hpi**

#### **6.8.1. Proteínas provenientes del complejo apical y proteínas de la familia SRS son las principales moléculas sobre -expresadas por *T. gondii* en la primera hora de interacción con PBMCs-h negativos**

Después de la eliminación de los DEGs hipotéticos en esta hora de comparación quedaron un total de 145 DEGs sobre expresados en *T. gondii* (**ver anexo 19**), evidenciando un importante enriquecimiento en genes en genes provenientes de la parte apical de *Toxoplasma*, **figura 50**. Dentro de los DEGs sobre expresados que provienen de dicho compartimento encontramos proteínas del Micronema (MIC3 y MIC4) y proteínas provenientes de las Roptrías (ROP8, ROP19A, ROP23, ROP31, ROP32 y tres (TGGT1\_409600, TGGT1\_411360, TGGT1\_308093) “rhoptry kinase family protein”), ver **Tabla 14**. Otro grupo de proteínas que estuvo muy bien representado en los DEGs sobre- expresados por *T. gondii* fueron las proteínas pertenecientes a la familia de las SRS con 14 en total (SRS22E, SRS13, SRS17A, SRS15C, SRS16B, SRS16C, SRS38C, SRS44, SRS12B, SRS22C, SRS28, SRS55A, SRS55M, SRS56), **Tabla 14**.



**Figura 50.** Análisis de enriquecimiento de componente celular en los 145 DEGs sobre expresados por *T. gondii* en la interacción con PBMCs-h negativos. Análisis de Ontología de genes (Componente celular) realizado en la plataforma **ToxoDB**.

**Tabla 14.** Principales familias de proteínas asociadas a los DEGs de *T. gondii* en la interacción con PBMCs-h negativos en la primera hora pi.

Family Proteins	gene	log2(fold_change)	Product Description
ROPs	TGGT1_232580	2.15871	propionate-CoA ligase
	TGGT1_242240	1.60607	rhoptry kinase family protein ROP19A
	TGGT1_215775	1.55157	rhoptry protein ROP8
	TGGT1_239600	1.37199	rhoptry kinase family protein ROP23 (incomplete catalytic triad)
	TGGT1_258800	1.11821	rhoptry kinase family protein ROP31
	TGGT1_270920	1.06033	rhoptry kinase family protein ROP32
SRSs	TGGT1_238470	inf	SAG-related sequence SRS22C
	TGGT1_219348	3.08718	SAG-related sequence SRS55M
	TGGT1_309300	2.65361	SAG-related sequence SRS55A
	TGGT1_267150	2.24753	SAG-related sequence SRS38C
	TGGT1_258550	2.09975	SAG-related sequence SRS28
	TGGT1_264660	2.06293	SAG-related sequence SRS44
	TGGT1_319360	1.80305	SAG-related sequence SRS17A
	TGGT1_321480	1.66418	SAG-related sequence SRS12B
	TGGT1_222370	1.66273	SAG-related sequence SRS13
	TGGT1_359770	1.50288	SAG-related sequence protein SRS22E
	TGGT1_320230	1.47416	SAG-related sequence SRS15C
	TGGT1_246070	1.37672	SAG-related sequence SRS56
	TGGT1_320190	1.16169	SAG-related sequence SRS16B
	TGGT1_320180	1.02431	SAG-related sequence SRS16C
MICs	TGGT1_244180	2.01491	microneme-like protein
	TGGT1_319560	1.45504	microneme protein MIC3
	TGGT1_208030	1.28832	microneme protein MIC4
AMA1	TGGT1_300130	1.26988	apical membrane antigen 1 domain-containing protein



**Tabla 15.** DEGs expresados a la baja en *T. gondii* que son relacionados a la categoría “regulación de la transcripción” en la primera hora de interacción con PBMCs-negativos en un modelo *ex vivo*.

Principales familias de proteínas asociadas a los DEGs expresados a la baja en <i>T. gondii</i> al interactuar con PBMCs-h negativos			
Family proteins	gene	log2(fold change)	product description
AP2 reguladores	TGGT1_217700	-1.77282	AP2 domain transcription factor AP2XII-2
	TGGT1_233120	-1.69116	AP2 domain transcription factor AP2VIII-2
	TGGT1_229370	-1.68385	AP2 domain transcription factor AP2VIII-1
	TGGT1_250800	-1.68257	AP2 domain transcription factor AP2XII-8
	TGGT1_227900	-1.62434	AP2 domain transcription factor AP2X-1
	TGGT1_202490	-1.59225	AP2 domain transcription factor AP2VIIA-7
	TGGT1_230150	-1.54837	ChAPs (Ch5p-Arf1p-binding proteins) protein
	TGGT1_224230	-1.417	AP2 domain transcription factor AP2X-3
	TGGT1_299150	-1.41248	AP2 domain transcription factor AP2III-3
	TGGT1_290630	-1.36487	AP2 domain transcription factor AP2IX-7
	TGGT1_289710	-1.3324	AP2 domain transcription factor AP2IX-5
	TGGT1_318470	-1.2989	AP2 domain transcription factor AP2IV-4
	TGGT1_225110	-1.21876	AP2 domain transcription factor AP2X-2
	TGGT1_306000	-1.1903	AP2 domain transcription factor AP2IX-8
	TGGT1_312570	-1.14676	CMGC kinase, MAPK family (ERK) MAPK-1
	TGGT1_271200	-1.14501	AP2 domain transcription factor AP2VIII-5
TGGT1_237090	-1.08589	AP2 domain transcription factor AP2X-5	
DNA	TGGT1_226480	-1.57177	DNA topoisomerase family protein
	TGGT1_209650B	-1.55705	RNA-directed DNA polymerase
	TGGT1_207760	-1.5316	DnaJ C terminal region domain-containing protein
	TGGT1_268600	-1.51256	DNA polymerase epsilon subunit B protein
	TGGT1_319860	-1.39305	DNA polymerase family B protein
	TGGT1_321450	-1.38423	Myb family DNA-binding domain-containing protein
	TGGT1_266390	-1.32967	DNA mismatch repair protein, C-terminal domain-containing protein
	TGGT1_293260	-1.18738	ATPase/histidine kinase/DNA gyrase B/HSP90 domain-containing protein
	TGGT1_243920	-1.04056	putative DNA replication licensing factor MCM5
	TGGT1_297780	-1.00836	ATPase/histidine kinase/DNA gyrase B/HSP90 domain-containing protein
Reguladores condensación	TGGT1_219100	-1.69193	cyclin-dependent kinase regulatory subunit protein
	TGGT1_209130	-1.52487	regulator of chromosome condensation (RCC1) repeat-containing protein
	TGGT1_280770	-1.38523	regulator of chromosome condensation (RCC1) repeat-containing protein
	TGGT1_313570	-1.18424	regulator of chromosome condensation (RCC1) repeat-containing protein
Ribosomas	TGGT1_218850	-1.91121	ribosomal protein RPS9
	TGGT1_216740A	-1.66967	riboflavin kinase
	TGGT1_309120	-1.62038	ribosomal protein RPL4
	TGGT1_266070	-1.29171	ribosomal protein RPL31
	TGGT1_320620	-1.27155	queuine tRNA ribosyl transferase
	TGGT1_312090	-1.22487	ribosomal protein RPL23
	TGGT1_248480	-1.22398	ribosomal protein RPS9
	TGGT1_231080	-1.18116	ribosomal protein RPL38
	TGGT1_300190	-1.18101	ribosomal protein RPL37A
	TGGT1_300000	-1.17764	ribosomal protein RPL18
	TGGT1_245680	-1.14653	ribosomal protein RPL21
	TGGT1_246000	-1.13838	large subunit ribosomal protein IMG2
	TGGT1_243570	-1.05956	ribosomal protein RPS26
	TGGT1_288720	-1.05851	ribosomal protein RPL10
	TGGT1_309820	-1.02077	ribosomal protein RPL11

## 1 h vs 6 hpi

### 6.8.3. El metabolismo de Piruvato y la replicación de ADN son los procesos principalmente enriquecidos en los DEGs sobre-expresados en *T. gondii* entre la primera y la sexta hora de interacción con PBMCs-h negativos

Los análisis de enriquecimiento de los 150 DEGs (ver anexo) que *Toxoplasma* sobre expresó (UP) en la interacción con PBMCs-h negativos entre la primera y la sexta hpi, ver **Anexo 21**, mostró múltiples procesos enriquecidos, entre ellos se destacan varios procesos metabólicos relacionados con el metabolismo de azúcares, sin embargo, el principal proceso enriquecido fue el “metabolismo de Piruvato”, ver **figura 52A**, **Anexo 22**. Otro proceso

importante que está altamente enriquecido en este contexto en *T. gondii* es la replicación de ADN, ver **figura 52B, Anexo 23**.

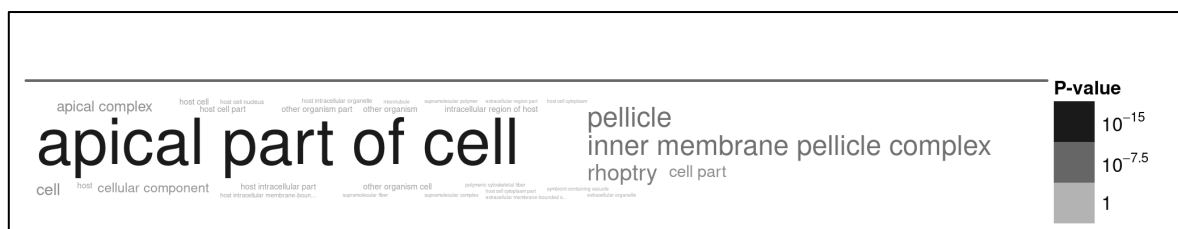


**Figura 52. A:** Análisis de enriquecimiento metabólico en los 150 DEGs sobre expresados en *T. gondii* al interactuar con PBMCs-h negativos entre la primera y la sexta hora. **B:** Análisis de enriquecimiento de procesos biológicos en los 150 DEGs sobre expresados en *T. gondii* al interactuar con PBMCs-h negativos entre la primera y la sexta hora. Análisis de Ontología de genes (Función Molecular) realizado en la plataforma **ToxoDB**.

**6.8.4. Proteínas provenientes del complejo apical (ROPs y RONs) son las principales moléculas que sufren una expresión a la baja en *T. gondii* cuando interactúa con PBMCs-h negativos entre la primera y sexta hora**

Cuando comparamos la primera y la sexta hora de interacción de parasito con PBMCs-h negativos, se obtuvieron 88 DEGs expresados a la baja en *T. gondii*, ver **Anexo 24**. EL análisis de enriquecimiento de estos 88 DEGs mostró un dominante enriquecimiento (21/88) en la categoría de “Complejo apical”

(“apical part of cell”), ver Figura 51, **anexo 25**. Dentro de las 21 moléculas se destacan varias proteínas ROPs (ROP1, ROP4, ROP5, ROP6, ROP7, ROP8, ROP11, ROP12, ROP14, ROP15, ROP18 y ROP40), varias proteínas RONs (RON1, RON2, RON3, RON5, RON6, RON8 y RON9) y también la presencia de proteínas importantes en la invasión del parásito provenientes del complejo apical como Toxolisina, la proteína MIC 8 y la alveolina. **Anexo 24**.



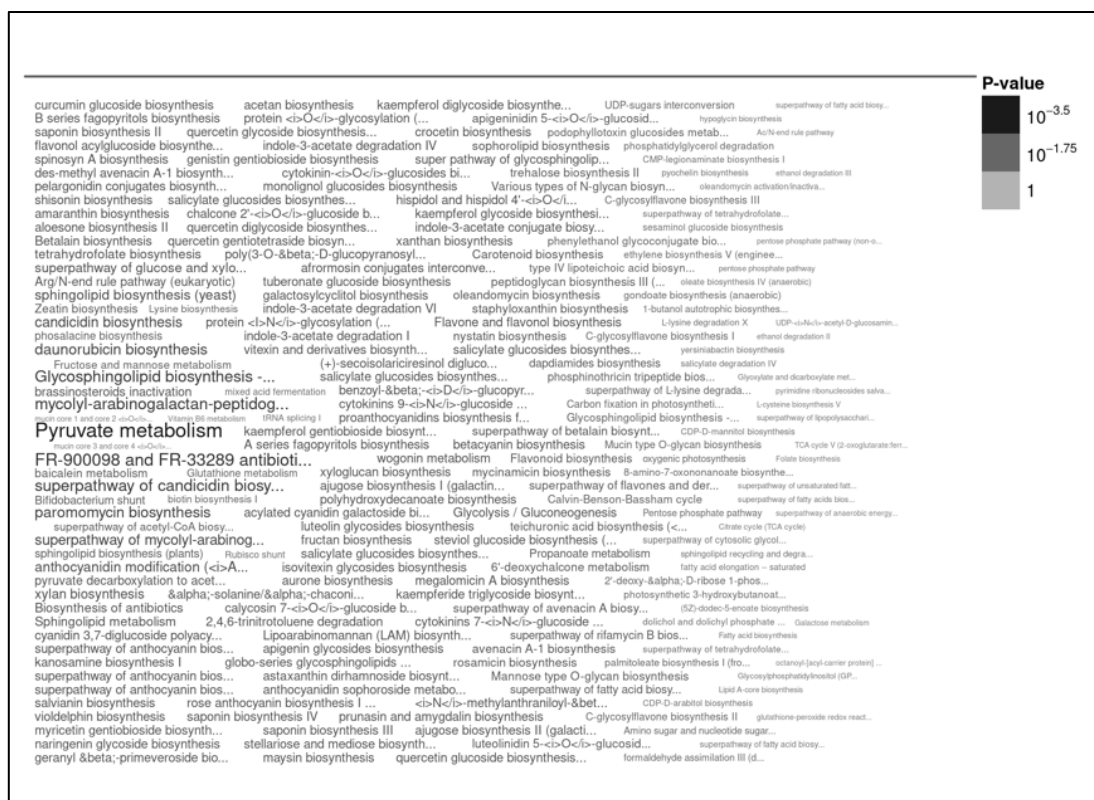
**Figura 53.** Análisis de enriquecimiento de los 88 DEGs a la baja en *T. gondii* al interactuar con PBMCs-h entre la primera y la sexta hora. Análisis de Ontología de genes (componente celular) realizado en la plataforma **ToxoDB**.

## 0 vs 6 hpi

**6.8.5. Un escenario altamente diverso en procesos de síntesis es lo que se relaciona con los DEGs que *T. gondii* sobre expresa en la interacción con PBMCs-h negativos entre la hora 0 y la hora 6 en nuestro modelo *ex vivo***

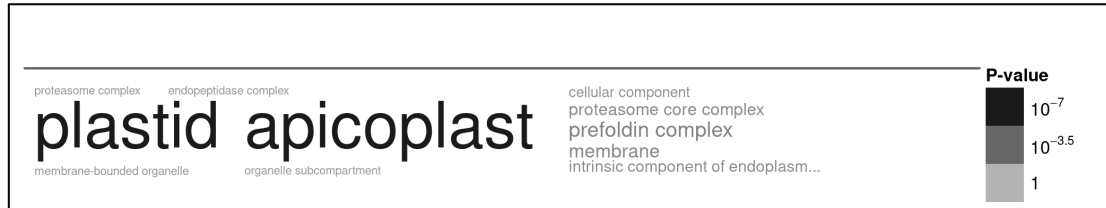
En este tiempo de comparación se presentaron 292 DEGs sobre expresados por parte de *T. gondii* en la interacción con PBMCs-h negativos, **ver anexo 26**. El primer aspecto a resaltar es la alta presencia de proteínas putativas (proteínas que se les ha asignado una posible función en las bases de datos, sin embargo, dicha función no ha sido probada) con un total de 45, **ver anexo 27**. El otro aspecto a resaltar de manera general es el escenario tan diverso en procesos metabólicos y de síntesis celular a los que están asociados los 292 DEGs de toxoplasma, ver **Figura 54**. Particularmente se encontró un enriquecimiento del metabolismo de piruvato y la síntesis de ácidos grasos,

entre muchos otros, ver **Figura 54**. A nivel de enriquecimiento de compartimentación, se encontró que un enriquecimiento importante en el “Apicoplasto” y en el “complejo prefolding”, ver **Figura 55**. Se pudo establecer otros procesos que parecen tener un enriquecimiento relevante de acuerdo al número de DEGs asociados, categorías como: “proteínas SRS” con 21 DEGs;” moléculas asociadas a ADN” con 15 DEGs y la categoría de “síntesis de folato” con 7 DEGs, **anexo 28**. Como dato interesante fueron muy pocas las proteínas provenientes del complejo apical que estuvieron sobre expresadas en esta comparación, entre las pocas se destacan 4 proteínas ROPs (ROP23, ROP26, ROP31 Y ROP39), una proteína proveniente de los gránulos densos, GRA3 y la proteína Antígeno apical de superficie conocida como AMA1.



**Figura 54.** Análisis de enriquecimiento metabólico de los 293 DEGs sobre expresados en *T. gondii* en la interacción con PBMCs negativos en la hora 0

vs la hora 6. Análisis de Ontología de genes (Función Molecular) realizado en la plataforma **ToxoDB**.



**Figura 55.** Análisis de enriquecimiento de componente celular de los 293 DEGs sobre expresados en *T. gondii* en la interacción con PBMCs negativos en la hora 0 vs la hora 6. Análisis de Ontología de genes (componente celular) realizado en la plataforma **ToxoDB**.

#### **6.8.6. Proteínas Alveolinas (*Inner Membrane Complex* IMC) y proteínas provenientes del complejo apical (ROPs y RON) son diferencialmente expresadas a la baja en *T. gondii* cuando comparamos la 0 y la sexta hora de interacción con PBMCs-h negativos**

Los análisis de enriquecimiento de las 182 DEGs a la baja presentes durante la interacción de *T. gondii* con PBMCs-h negativos, **Anexo 29**, muestran estar relacionados de manera predominante con proteínas de la familia Alveolinas-IMC ( IMC1, IMC3, IMC6, IMC8, IMC9 y IMC15), **Anexo 30**, y otro grupo importante de proteínas provenientes del complejo apical, ver **Figura 56**, entre las que se destacan ROPs (ROP1, ROP4, ROP5, ROP6, ROP8, ROP11, ROP12, ROP14 y ROP40) y proteínas RONs (RON1, RON2, RON3, RON5, RON6, RON8 y RON9), ver **Anexo 30**.





**Figura 56.** Análisis de enriquecimiento de los 182 DEGs presentes en *T. gondii* durante la interacción con PBMCs-h negativos en un modelo *ex vivo*. Análisis de Ontología de genes realizado en la plataforma **ToxoDB**.

## 7. DISCUSIÓN

### Los PBMCs-h como modelo de estudio *ex vivo* sin suplementos (MeExSs) en *T. gondii*

En la presente investigación, evaluamos algunos aspectos técnicos y metodológicos muy importantes que nos permitieron establecer un modelo de estudio *ex vivo* sin suplementos (sin suero fetal bovino y/o antibióticos) (**MeExSs**) para la investigación de la interacción hospedero-parásito entre PBMCs humanos y taquizoítos de *Toxoplasma gondii*. Frecuentemente no es posible trabajar con PBMCs humanos recién aislados (103), sin embargo, en los casos en que se puede acceder a una muestra reciente y fresca, es fundamental estandarizar las condiciones mínimas de cultivo (115), especialmente si existe la necesidad sentida de hacer comparables los estudios inmunológicos entre sí (84). En este proyecto de investigación, proponemos el **MeExSs** en PBMCs-h como un modelo adecuado para el desarrollo de investigaciones relacionadas con las primeras etapas en la interacción humano-*Toxoplasma*. Hasta donde sabemos, es la primera vez que se describe el comportamiento de los PBMCs humanos sin ningún tipo de suplementos de cultivo celular. Dentro de los hallazgos relevantes, encontramos que 24 horas es un tiempo adecuado para desarrollar un modelo *ex vivo* utilizando PBMC humanas sin ningún suplemento, sin crio-preservación y obteniendo una viabilidad celular superior al 80%. Previamente se han descrito diversos estudios relacionados con la interacción entre *T. gondii* y diferentes tipos de células humanas (130,131), incluyendo PBMCs humanas (88,93,94,112,132,133), sin embargo, ninguno de ellos se realizó con condiciones de cultivo no suplementado *ex vivo*. Por lo general, la mayoría de estos estudios utilizaron PBMCs humanas crio-preservadas, y precisamente este fue uno de los aspectos que el modelo quiso evitar, pues recientemente se ha demostrado que la crio-preservación de PBMCs altera

drásticamente la expresión de los genes de este tipo de células (107). Con frecuencia también se utiliza suero fetal bovino para mantener el cultivo celular en el tiempo, sin embargo, al igual que con la crio-preservación, recientemente se ha demostrado que el uso de Suero fetal bovino (SFB) también afecta dramáticamente la expresión génica (134). En consecuencia, este fue otro reto metodológico que se consideró evitar en el modelo en aras de hacer comparables los resultados experimentales, especialmente si el interés estaba relacionado con RNA-seq, donde el principal objetivo es observar la expresión diferencial de genes. Generalmente unas células pueden durar entre 5 a 10 días en cultivos suplementados, sin embargo nuestros resultados mostraron que existe un impacto importante en la viabilidad de las PBMC si no se utiliza suero fetal bovino en condiciones de cultivo ex vivo, mostrando una reducción significativa de la viabilidad celular, cercana al 40% desde el día 3, estos resultados son menores en comparación con los experimentos con PBMC humanas donde se ha utilizado el SFB como suplemento y se ha observado una viabilidad celular después de 5 días (85). Nuestros datos indican que las células HFF parecen un modelo más adecuado para replicación de *T. gondii* en comparación con las PBMC humanas, sin embargo, nosotros demostramos que en **MeExSs** la infección de las PBMCs humanas por *T. gondii* se produjo desde la primera hpi de una manera dosis dependiente, similar a lo informado por Chanon et al. (132).

Las PBMC humanas están constituidas por varios tipos de células inmunes que incluyen monocitos, células T, células NK, entre otras. No se observaron diferencias en la viabilidad entre las subpoblaciones de PBMCs en los 5 días de seguimiento, correspondiendo la mayor proporción de células a linfocitos, con porcentajes de hasta el 85%, similar a lo reportado en un estudio anterior (135). Esto muestra que, aunque la viabilidad de las PBMC humanas en **MeExSs** disminuyó durante los 5 días de evaluación, siendo más crítico a partir

del día 3, las subpoblaciones celulares se ven afectadas proporcionalmente de la misma manera a lo largo del tiempo.

Dado que la infección por *T. gondii* en humanos es fundamentalmente diferente a la de ratones, es necesario profundizar en modelos humanos existentes, como los PBMCs humanos. Aquí exploramos el posible efecto inmunomodulador de los PBMC-h (células inmunes especializadas), sobre células HFF (sin especialización inmune) infectadas con *T. gondii*. Se encontraron resultados interesantes, que sugiere un posible efecto modulador de las células inmunes de memoria, ya que se observó una disminución de la fluorescencia en las células HFF infectadas después de colocar PBMC de individuos crónicos 24 hpi en comparación con el tratamiento con PBMC de individuos seronegativos 24hpi. Dado que era un ensayo exploratorio, y no se midieron citoquinas, un proceso inmunológico que podría explicar nuestras diferencias en un posible efecto inmunomodulador de las PBMC humanas crónicas sobre las células HFF infectadas con *T. gondii*, podría estar relacionado con las actividades de las citocinas, especialmente el efecto Interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ). Se ha demostrado ampliamente que el IFN- $\gamma$  gamma es una de las citocinas más importantes para controlar la infección del parásito (136). Recientemente, nuestro grupo de investigación demostró que las PBMC humanas crónicas (Toxo IgG-positivas) estimuladas con RH *T. gondii* expresan más niveles de IFN- $\gamma$  en comparación con las PBMC humanas negativas (Toxo IgG-negativas) 24 horas después de la infección (137)., De la misma manera, otros investigadores habían demostrado que la muerte celular inducida por IFN- $\gamma$  y la salida temprana limita la replicación de *T. gondii* en las HFF y podría promover la eliminación del parásito por las células inmunes (138). Basado en el efecto diferencial entre la inmunidad innata versus la inmunidad adaptativa, estos posibles efectos inmunomoduladores de las PBMC humanas, también podrían explicarse parcialmente por sinapsis inmunológicas (139), donde se ha demostrado que el IFN  $\gamma$  secretado a través

de una sinapsis, bajo un efecto paracrino, promueve la activación de las células que están muy próximas sin tener que estar en relación directa con la célula efectora (140), también podría ser explicado por alguna otra capacidad desconocida de comunicación entre células, tal como se ha demostrado en *L. monocytogenes* donde la señalización de peligro se propaga a través de los tejidos antes de que ocurra la propagación de patógeno infeccioso (141). Estos resultados sugieren que las diferencias encontradas en nuestros datos podrían explicarse en parte por la mayor secreción de IFN- $\gamma$  en PBMC de individuos crónicos en comparación con individuos negativos, sin embargo, esto debe ser comprobado y en el caso de la infección humana por *Toxoplasma* se requieren más experimentos futuros para comprender la comunicación intercelular.

### **RNA-seq**

En los últimos años, la tecnología RNA-seq se ha considerado como una técnica altamente eficaz, de bajo precio (accesible) y ha empezado a ser utilizada en la investigación de muchas enfermedades infecciosas incluida la toxoplasmosis. Sin embargo, los estudios de este tipo en *T. gondii* se han enfocado principalmente en el modelo murino o porcino (84,113) y unos pocos estudios en gatos (142) siendo mucho más extraordinarios los estudios en modelos celulares humanos. En consecuencia, continúa siendo sorprendente lo poco que se sabe con respecto a la respuesta humana a la infección por *Toxoplasma* (143). Con respecto a los estudios duales en *Toxoplasma*, la mayoría de estos se han llevado a cabo utilizando otros modelos celulares, como células derivadas de músculo esquelético, neuronas, astrocitos y fibroblastos murinos (144), y de nuevo, el uso de PBMCs, en estudios duales se ha restringido principalmente al modelo porcino (113,121). En este estudio, por primera vez se evaluaron y analizaron los transcriptomas, tanto de los PBMCs humanos como del parásito *Toxoplasma gondii* RH, en un modelo de interacción celular *ex vivo* sin suplementos (**MeExSs**: Objetivo 1). Además,

también evaluamos el efecto en la interacción de las variaciones en el perfil de expresión de genes respecto a la condición Toxo IgG+ (CRO) e IgG- (NEG) de los PBMCs-h.

Los genes diferencialmente expresados (DEGs) en la interacción PBMCs-humanos (PBMCs-h) y *Toxoplasma gondii* RH muestran que la interacción es dependiente de la condición IgG+ o IgG- de los PBMCs-h. En cuanto al número de DEGs no encontramos una diferencia importante excepto a la sexta hora de interacción donde se observaron 467 DEGs más en la condición IgG+. Para comprender mejor los cambios fisiopatológicos en la infección por *T. gondii* en PBMCs-h, es necesario evaluar los genes diferencialmente expresados en diferentes etapas de la infección por parte de ambos actores, por esta razón son claves los estudios de series de tiempo, entre más puntos de muestreo mejor, dado que se puedan evaluar y evidenciar los diversos cambios que presentan los genes a través de la interacción y de esta manera estar más cerca de elucidar sus posibles funciones biológicas (145). Con relación a este punto, nosotros en este estudio encontramos una relación directa entre el tiempo de la interacción hospedero-parasito (0h vs 1hpi: T1, 1h vs 6hpi: T2; 0 vs 6hpi: T3) y la abundancia de DEGs presentes en la interacción, pero dicha relación directa (tiempo/número de DEGs) estuvo solo restringida para el caso de los PBMCs-h; en el caso de *Toxoplasma* esta relación no fue observada. Lo anterior puede ser evidente cuando observamos que en PBMCs-h-NEG la relación tiempo/numero de DEGs donde se presentaron un total de 121 DEGS (T1), 1165 (T2) y 2195 (T3). El mismo fenómeno fue observado en PBMCs-h -CRO con un total de 198 DEGs (T1), 1043 (T2) y 2662 (T3). Sorprendentemente, en el caso de *Toxoplasma*, este fenómeno no fue observable en ninguna condición ni en ninguna hora de interacción. El número total de DEGs por parte del parásito en la interacción con PBMCs-h-NEG fue de 699 (T1), 428 (T2) y 989 (T3), y en el caso de la interacción con PBMC-h-CRO los números se vieron sustancialmente disminuidos, con un total de 12

(T1), 66 (T2) y 8 (T3). Todos estos resultados en relación al tiempo y el número de DEGs presentes en *Toxoplasma* son contrarios a los reportados por el análisis transcriptómico dual de Zho et al. en 2016 (110), donde demostraron en una dinámica mucho más amplia en el tiempo, que en células PK-15 de porcino, la hora 1pi era el momento de mayor expresión en relación a la abundancia de DEGs en *Toxoplasma*, frente a la hora 6pi que fue el momento de mayor abundancia de DEGs en la célula hospedadora. Estas diferencias frente a la abundancia total de DEGs en la temporalidad de la expresión podrían estar indicando, una vez más, que *T. gondii* tiene un comportamiento tejido específico en relación a la expresión de genes (144,146).

Otro aspecto que mostramos en nuestro estudio, que apoya el argumento de expresión tejido específico en la interacción de *T. gondii* con sus hospedadores, surge cuando analizamos los DEGs que se presentaron de manera exclusiva en cada grupo de PBMCs-h y en cada uno de los tiempos, evidenciando dos perfiles de expresión disímiles cuando se comparan los procesos biológicos asociados a cada grupo de DEGs, tanto en PBMCs-h-NEG como en PBMCs-h-CRO. En el caso de PBMCs-h-NEG, los DEGs en cada uno de los tres tiempos evaluados muestran siempre un enriquecimiento funcional relacionado principalmente a respuesta inmune innata, respuesta mediada por citoquinas y varios procesos de respuesta inespecífica. Al observar los procesos enriquecidos en los DEGs de PBMCs-h-CRO, el perfil inmunológico dominante solo estuvo presente en la primera hpi, mientras que en los siguientes tiempos los perfiles de enriquecimiento funcional de PBMCs-h-CRO no presentan un perfil inmunológico dominante, destacándose, procesos como: el ciclo celular y los motivos de unión a factores de transcripción (TFBSs). EL ciclo celular ya ha sido descrito como un punto importante en la infección del parásito (147,148) de hecho se ha demostrado que este parásito es capaz de inducir un arresto del ciclo celular para mantener aumentar el tiempo de permanencia en las células hospedadoras y

favorecer su multiplicación(149). En nuestro caso tal condición podría estar relacionada con una posible estrategia en esta dirección o con una posible respuesta a la presión inmunológica ejercida por las células hospedadoras debido a la inmunidad adaptativa. En relación a los TFBSs como potenciales blancos en los sets de datos tanto de CRO como en NEG es importante destacar la presencia de tres factores de transcripción que se presentaron solo en la condición CRO (TFZF5, TFE2F2 y TF TCF1), los dos primeros asociados con la producción de citoquinas (150) y el ultimo asociado con la función efectora en células agotadas en las infecciones crónicas (151), planteando la pregunta sobre si el parasito esta teniendo como blanco este factor de transcripción en respuesta a la inmunidad adaptativa dado que no se presenta genes relacionados con este factor de transcripción en la interacción de *T. gondii* con PBMCs NEG.

Mas sorprendente aún es el comportamiento radicalmente distinto del parasito frente a la condición IgG de los PBMCs-h; pues se observó que cuando el parasito enfrentó los PBMCs-h IgG- se presentaron cientos de DEGs en cada condición evaluada, en comparación a solo unos pocos DEGs cuando el parasito interactuó con PBMCs IgG+. Las diferencias no son solo en número de DEGs, sino que son diferencias principalmente en los procesos biológicos asociados a los DEGs, tanto en *Toxoplasma* como en los PBMCs humanos (IgG+ e IgG-). En consecuencia, muchos de estos cambios parecen propios en la infección de PBMCs-h respecto al comportamiento de la infección en el modelo mas conocido y estudiado que es el modelo ratón. Todos nuestros resultados anteriores, sugieren que no se trata solo de una expresión tejido específica, sino también una interacción patógeno-huésped especie-específica, tal como lo han reportado otros autores (152). Tal es caso la IL12 y el INF-gamma que en la respuesta mediada por la inmunidad innata son moléculas importantes y preponderantes para el control de la toxoplasmosis en el modelo murino (152), sin embargo no fue encontrada alterada en ninguna



de las condiciones evaluadas en los PBMCs-h en el modelo *ex vivo*, esta no es la primera vez que se presenta esta particularidad, pues recientemente en un estudio en PBMCs humanos también fue observado la ausencia de IL12 a las 12hpi (112). Otra diferencia importante con relación a la infección por *Toxoplasma* en ratones, está relacionada con la inducción de iNOS, que en ratón se ha demostrado que cataliza la conversión de L-larginina a L-citrulina y da como resultado la generación de NO (óxido nítrico), presentándose el NO como un efector fundamental en macrófagos murinos para defenderse de *Toxoplasma* pero no en monocitos/macrófagos humanos (153,154). Nuestros datos confirman que dicho mecanismo estuvo completamente inalterado en PBMCs-h. Esta observación fue consistente en todas las condiciones, tiempos y en ambos tipos de PBMCs-h evaluados. Estas divergencias que reportamos con en la producción y los modos de función de NO y la IL12 - INF-gamma entre diferentes especies (humano-ratón) y el hecho de que la detección intracelular humana de *Toxoplasma* difiera de los ratones puede ser explicada debido a que los humanos no tienen equivalentes funcionales a los receptores murinos tipo Toll (TLR) 11 y 12), de hecho recientemente se demostró que la Alarmina S100A11 humana es la proteína responsable de la iniciación de la respuesta por quimioquinas a la infección por *T.gondii* en un modelo de PBMCs, mostrando una particularidad no encontrada en murinos(112), sin embargo surge una vez más la dificultad para contrastar nuestros datos con este estudio, debido a que en el citado estudio se utilizó SFB y criopreservación además de tener solo una medida a las 12hpi, indicando de nuevo la necesidad de tener protocolos estandarizados, comparables respecto al tiempo en la toma de los datos (mas si se trata de ensayos de expresión diferencial de genes) y mostrando que es necesario profundizar en el esclarecimiento de estos mecanismos en el humano.

En relación a los DEGs comunes entre los PBMCs-h IgG- y los PBMCs-h IgG+ en la primera hpi, se encontró que la respuesta inmune innata es el proceso

más enriquecido, destacándose procesos sobre -expresados (UP) específicamente con la respuesta Th17 y diferenciación de CD4, indicando que esta respuesta es independiente de la condición IgG de los PBMCs-h. El papel de la respuesta Th17 sigue siendo controversial en *Toxoplasma* (117), sin embargo, nuestros resultados concuerdan con diversos estudios que muestran que gran parte de la IL-17 liberada durante una respuesta inflamatoria es producida por células del sistema inmune innato (155).

Dentro de la respuesta específica (DEGs exclusivos) de los PBMCs-h negativos, encontramos que en la primera hora de interacción con *T. gondii* se observa una gran cantidad de moléculas relacionadas con la señalización celular en genes sobre-expresados (UP), mientras que los genes regulados a la baja (DOWN) se encuentran relacionados a respuesta mediada por citoquinas y respuesta inflamatoria; de manera muy interesante, este perfil inflamatorio DOWN en NEG se encuentra contrario en CRO, donde el perfil inflamatorio esta up-regulado. Este fenómeno parece relacionado con la presencia de genes antagónicos exclusivamente en la primera hora de interacción *Toxoplasma*-PBMCs-h, donde se observa que al menos 14 DEGs están participando de manera importante en la regulación de la respuesta inflamatoria en CRO-UP, presentándose al mismo tiempo sobre expresión de genes pro y anti-antiinflamatorios; como la IL-6 y la IL-10 respectivamente, siendo esta ultima una de las citoquinas más importantes para el control de la *Toxoplasmosis* (60,156,157). El repertorio de moléculas anti-inflamatorias que se presentan en PBMCs-h CRO es mucho más amplio, destacándose también la sobre expresión de CCL17 y CCL22, dos moléculas que se han demostrado como un sistema de balance de la respuesta inflamatoria en macrófagos murinos (158). Realizando un análisis de factores de transcripción asociados a estos 14 genes antagónicos, se encontró que al menos 6 de ellos tienen en común el factor de transcripción NFkB1 y el factor de transcripción RELA, ambos precursores importantes del complejo NFkB, el cual está ampliamente

demostrado que es determinante en control del parásito desencadenando una respuesta inflamatoria (159). En consecuencia, consideramos el clúster de genes antagónicos involucrados en la regulación de la inflamación y los dos factores de transcripción como importantes moléculas para avanzar en la comprensión de la respuesta inmune contra *T. gondii* en humanos. En este trabajo reconocimos además 4 genes (VCAN, FGL2, PCAM1, THBD) (ver anexo4), que son antagónicos, pero que se sobre-expresan en NEG y son expresados a la baja en CRO en la primera hora de interacción; lo interesante de estos 4 genes es que todas la proteínas que se producen de estos genes son glicoproteínas de señalización de superficie que potencialmente podrían estar siendo modulados por el parásito en PBMCs-h en la primo-infección y se sabe que este tipo de proteínas suelen ser puntos de contacto importantes del parásito con sus hospedadores (5,18).

En cuanto a los DEGs en *T. gondii*, encontramos un alto número en la interacción con PBMCs-h NEG y un bajo número de DEGs en PBMCs-h CRO (anexo5). De manera similar, el fenómeno de bajos DEGs por parte de *Toxoplasma* en la interacción con sus células hospederas ya fué observado en células PK15 de porcino, donde a las 6 hpi se observa una reducción importante en el numero de DEGs siendo casi totalmente ausentes a partir de las 12 hpi (110). Sin embargo, aún no es claro porque se presenta este fenómeno. Nosotros con nuestros datos y al ser solo la condición IgG las diferencias en la interacción, una hipótesis posible para este fenomeno podría estar relacionada con una respuesta inducida por un escenario mas adverso o de mayor stress para *Toxoplasma* al inicio de la interacción con PBMCs-h IgG+, pues se trata de un segundo encuentro donde la inmunidad adaptativa esta jugando un papel preponderante frente al parasito en comparación a la interacción de *Toxoplasma* con IgG- que es una primo-infección, donde el sistema inmunológico suele ser mas exacerbado y descontrolado.

Otro de los aspectos más relevante que encontramos en los DEGs de *Toxoplasma* es que un gran porcentaje de ellos son “proteínas hipotéticas” (entre un 32 y un 67%), por lo cual desconocemos su función biológica, este alto porcentaje de “proteínas hipotéticas” dificultó profundamente la interpretación funcional de los roles del parásito en la interacción con PBMCs-h y tuvieron que ser eliminadas de los análisis de enriquecimiento. Un dato importante que se observó dentro de este set de moléculas es que alrededor de un 20% de estas proteínas hipotéticas presenta péptido señal, lo cual sugiere que efectivamente por lo menos este porcentaje de moléculas potencialmente son secretadas por el parásito, convirtiéndose en otro grupo de proteínas interesantes para avanzar en la comprensión del comportamiento de *Toxoplasma* en la interacción con células humanas. Con los DEGs resultantes después de descartar el alto porcentaje de DEGs hipotéticos, realizando un análisis general en la plataforma ToxoDB.org, encontramos que la toxofilina y ROP8 fueron genes sobre-expresados de manera común en la primera hora de interacción. La toxofilina se ha establecido que es una molécula muy importante para la motilidad y la invasión del parásito (34), por lo que parece igualmente importante en la interacción con PBMCs-h, mostrando además una independencia de la condición IgG de los PBMCs-h.

En cuanto a ROP8, es una pseudokinasa que ha estado relacionada a la virulencia del parásito formando un complejo con ROP2, ROP18 Y GRA7 (160); sin embargo, los demás genes del complejo no fueron alterados en nuestros datos. De hecho, un dato relevante es la ausencia de un enriquecimiento general en relación a las proteínas ROPs clásicas como por ejemplo, ROP5, ROP17, ROP18, ROP16, descritas como importantes factores de virulencia en el modelo ratón y típicamente sobre-expresadas en la invasión (161); indicando nuevamente que esos factores de virulencia quizá desempeñan un rol más preponderante en el modelo murino, y considerándose de nuevo la importancia de reconocer e identificar los

principales factores de virulencia en humanos o evaluar si tienen papel más tarde en la infección, como por ejemplo en el enquistamiento. En su lugar, encontramos otras proteínas ROPs sobre-expresadas y mucho menos estudiadas como son ROP19A, ROP23, ROP31 y ROP32 en el inicio de la interacción (0h vs 1h) ver Anexo7, que también serían unos blancos interesantes para explorar su papel en la interacción con células humanas, pues algunas de ellas ya han sido evaluadas experimentalmente en otros modelos celular mostrando en el caso de ROP31 tener una expresión diferenciada en el desarrollo del parásito a diferencia de ROP32 que ha mostrado más un carácter constitutivo (161), por lo que su rol en la interacción con células humanas todavía es desconocido.

En resumen, aquí presentamos por primera vez un análisis transcriptómico dual en el modelo **MeExSs**, donde se describe la interacción entre *Toxoplasma* y PBMCs-h. Los perfiles de expresión, tanto de las células como del parásito indican que la interacción difiere a la presentada de manera general en el modelo murino, por lo que se hace evidente la necesidad de continuar profundizando en la comprensión tejido específica y especie específica entre *Toxoplasma* y sus células hospederas. Finalmente, se describe también la presencia de genes sobre-expresados de manera exclusiva en las primeras etapas de la interacción, genes antagónicos y factores de transcripción, tanto del parásito como de los PBMCs-h, que se perfilan como blancos y candidatos importantes para la profundización en el estudio y la comprensión de la dinámica de la interacción *Toxoplasma*-humano.

## 8. CONCLUSIONES

- Se establecieron las condiciones para la realización de estudios de interacción hospedero parasito en PBMCs humanos sin suplementos y sin crio-preservación (**MeexSs**).
- La viabilidad cercana al 80 % en los PBMCs humanos en modelo **MeexSs** solo se logra en las primeras 48 horas de incubación en cultivo, siendo un modelo apropiado para las primeras etapas de la interacción.
- La infección de *T. gondii* RH en el modelo **MeexSs** es dosis dependiente y no debería ser menor a 1 célula vs 3 parásitos.
- El número de PBMCs adecuado para la infección es de 500.000 PBMCs. El tiempo mínimo de incubación para garantizar la adherencia (90% aprox.) de los PBMCs a la placa de cultivo es de 2 horas previo a la infección con *T. gondii*.
- Se observa un efecto modulador por los PBMCs de los individuos crónicos frente a los individuos negativos sobre el cultivo de células HFF infectadas con *T. gondii* RH-GFP, lo cual sugiere que la condición clínica de infección o no infección previa (Toxo-IgG positivo vs Toxo-IgG negativos) podría interferir resultando en una respuesta radicalmente diferente durante la interacción parasito-hospedero.
- No se encontraron diferencias importantes respecto al número de DEGs en las diferentes condiciones evaluadas en las primeras horas de la interacción de *T. gondii* y PBMCs humanos. CRO-197 (1h) vs NEG-121 (0h vs 1h); CRO-1043 vs NEG-1162 (1h vs 6h); CRO-2662 vs NEG-2195 (0h vs 6h).
- Se observa que una parte de la respuesta inmunológica de los PBMCs humanos es independiente de la condición de existencia de IgG frente a *T. gondii*. Dicho perfil inmunológico es dominante en las primeras fases de la interacción con el parasito. Encontrándose una alteración

de moléculas importantes de la inmunidad innata e interleuquinas como la IL4, IL10 y la IL13.

- Se evidenció que existe un efecto de la condición IgG de los PBMCs en interacción con *T. gondii*. Dentro de la respuesta específica de los PBMCs crónicos no se evidencia un perfil inmunológico dominante después de la sexta hora a diferencia de la respuesta de los PBMCs negativos que mantienen en todos los tiempos y todas las comparaciones un perfil predominantemente inmunológico.
- La respuesta de los PBMCs crónicos frente a *T. gondii* parece estar muy relacionada con la regulación génica a través de factores de transcripción.
- En *T. gondii* no se evidencia una expresión diferencial de genes importante en los PBMCs provenientes de individuos con infección crónica en las primeras etapas de la interacción.
- En *T. gondii* se evidencia un número elevado de genes diferencialmente expresados en la infección a PBMCs de individuos negativos para la enfermedad.
- No existen “hotspot” a nivel de cromosomas en los DEGs de PBMCs de ningún grupo de los individuos evaluados.
- Existe un número importante de proteínas hipotéticas en los DEGs durante la interacción toxoplasma-PBMCs humanos.

## 9. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

- Realizar la Validación del modelo de interacción **MeexSs** por otras técnicas moleculares como PCR en tiempo real, haciendo énfasis en los principales DEGs encontrados como posibles blancos de la interacción humano-Toxoplasma.
- Evaluar el modelo **MeexSs** en otras series de tiempo con el fin de establecer una dinámica más completa de la interacción *Toxoplasma* - PBMCs humanos.
- Aumentar el número de muestras de cada grupo para hacer RNA-seq, con el fin de establecer posibles candidatos a biomarcadores.
- Analizar a partir de los datos obtenidos por RNA-seq posibles redes de co-expresión entre *Toxoplasma gondii* y PBMCs humanos.
- Evaluar y validar las rutas de genes, factores de transcripción y genes antagonicos encontrados en la interacción en el modelo **MeexSs** con el fin de mejorar la comprensión de la toxoplasmosis humana.
- Evaluar PBMCs de individuos crónicos (IgG+) con Toxoplasmosis ocular y compararlos con los crónicos asintomáticos evaluados en este estudio.



## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Blader I, Coleman B, Chen C, Gubbels M, Hill C. The lytic cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 years later. 2015;463–85.
2. Ayala FJ and EA. Evolutionary origin of Plasmodium and other Apicomplexa based on rRNA genes. 1995;92(June):5793–7.
3. Foth BJ MG. The apicoplast: a plastid in Plasmodium falciparum and other Apicomplexan parasites. ;224:57-110. Int Rev Cytol. 2003;74.
4. Carruthers VB, Tomley FM. Microneme Proteins in Apicomplexans. Mol Mech Parasite Invasion. 2008;33–45.
5. Costa R, Langoni H. *Toxoplasma gondii*: host – parasite interaction and behavior manipulation. 2009;893–8.
6. Nicolle C ML. Sur une infection a coyoes de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. C R Hebdomad Seance Acad Sci. 1908;147:763–766.
7. Dubremetz JF. Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. Vol. 6, Trends in Microbiology. 1998. p. 27–30.
8. Grigg ME, Sundar N. Sexual recombination punctuated by outbreaks and clonal expansions predicts *Toxoplasma gondii* population genetics. Int J Parasitol [Internet]. 2009;39(8):925–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.005>
9. Hoffmann S, Batz MB. Annual Cost of Illness and Quality-Adjusted Life Year Losses in the United States Due to 14 Foodborne Pathogens 3. 2012;75(7):1292–302.
10. Gómez-Marin JE, de-la-Torre A, Angel-Muller E, Rubio J, Arenas J, Osorio E, et al. First colombian multicentric newborn screening for congenital toxoplasmosis. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5(5).
11. Franco-hernandez EN, Cortés-vecino J, Gómez-marin E. Survey for. 2016;115(2):691–5.
12. Lindsay D, Blagburn BL, Dubey JP. Survival of nonsporulated *Toxoplasma gondii* oocysts under refrigerator conditions. Vet Parasitol. 2002 Mar 1;103:309–13.

13. Niesman I, Sibley LD, Mordue DG, Ha S. *Toxoplasma gondii* Resides in a Vacuole That Avoids Fusion with Host Cell Endocytic and Exocytic Vesicular Trafficking Pathways. 1999;99:87–99.
14. West-eberhard MJ. PHENOTYPIC PLASTICITY AND THE ORIGINS OF DIVERSITY. 1989;
15. Ajzenberg D, Collinet F, Mercier A, Vignoles P, Dardé ML. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay. J Clin Microbiol. 2010;48(12):4641–5.
16. Tibayrenc M, Ayala FJ. Towards a Population Genetics of Microorganisms : The Clonal Theory of Parasitic Protozoa. 1991;7(9):228–32.
17. Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii* - The first 100 years. Journal of Eukaryotic Microbiology. 2008.
18. Carruthers VB, Håkansson S, Giddings OK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* Uses Sulfated Proteoglycans for Substrate and Host Cell Attachment. 2000;68(7):4005–11.
19. Kasper LH. Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. J Immunol. 2018;150:3951–2964.
20. Mineo JR KL. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cell involves major surface protein, SAG-1(P30). Exp Parasitol. 1994;79:11–20.
21. Wang Y, Yin H. Research progress on surface antigen 1 ( SAG1 ) of *Toxoplasma gondii*. Parasit Vectors [Internet]. 2014;7(1):1–9. Available from: Parasites & Vectors
22. Carruthers V, Boothroyd JC. Pulling together : an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. Curr Opin Microbiol. 2007;10:83–9.
23. Velge-roussel F, Chard T, Brillard M, Bout D. Epitopic analysis of the *Toxoplasma gondii* major surface antigen SAG1. 1994;66:31–8.
24. Debard N, Buzoni-gatel D, Infectieuses M. Intranasal Immunization with SAG1 Protein of *Toxoplasma gondii* in Association with Cholera Toxin Dramatically Reduces Development of Cerebral Cysts after Oral Infection. 1996;64(6):2158–66.
25. Kieschnick H, Wakefield T, Narducci A, Beckers C, Kieschnick H, Wakefield T, et al. TRANSDUCTION : *Toxoplasma gondii* Attachment to Host Cells Is Regulated by a Calmodulin-like Domain Protein Kinase *Toxoplasma gondii* Attachment to Host Cells Is Regulated by a

- Calmodulin-like Domain Protein Kinase \*. 2001;
26. Soldati D, Francois J, Lebrun M. Microneme proteins : structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. 2001;31:1293–302.
  27. Sheiner L, Santos JM, Klages N, Parussini F, Friedrich N, Ward GE, et al. *Toxoplasma gondii* transmembrane microneme proteins and their modular design. 2011;77(4):912–29.
  28. Straub K, Cheng S, Sohn C BP. Novel components of the Apicomplexan moving junction reveal conserved and coccidian-restricted elements. 2010;11(4):590–603.
  29. Alexander DL, Mital J, Ward GE, Bradley P, Boothroyd JC. Identification of the Moving Junction Complex of *Toxoplasma gondii* : A Collaboration between Distinct Secretory Organelles. 2005;1(2).
  30. Sharma P, Chitnis CE. Key molecular events during host cell invasion by Apicomplexan pathogens. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2013;16(4):432–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2013.07.004>
  31. Sheetz MP, Sable JE. Continuous Adhesion Requires Continuous Accommodation to Lipid and Cytoskeleton Dynamics. 2006;
  32. Dobrowolski JM, Sibley LD. *Toxoplasma* Invasion of Mammalian Cells Is Powered by the Actin Cytoskeleton of the Parasite. 1996;84:933–9.
  33. Papoin J, Roques M, Normand BV, Fauquenoy S, Tomavo S, Bart W, et al. The RON2-AMA1 Interaction is a Critical Step in Moving Junction-Dependent Invasion by Apicomplexan Parasites. 2011;7(2).
  34. Poupel O, Boleti H, Axisa S, Couture-tosi E, Tardieux I, Interactions DB. Toxofilin , a Novel Actin-binding Protein from *Toxoplasma gondii* , Sequesters Actin Monomers and Caps Actin Filaments. 2000;11(January):355–68.
  35. Laliberte J, Carruthers VB. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. 2009;65(12):1900–15.
  36. E. Suss-Toby, J. Zimmerberg and GEW. *Toxoplasma* invasion : The parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. 1996;93(August):8413–8.
  37. Joinert KA. The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. 1994;91(January):509–13.

38. Sinai AP, Joiner KA. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. 2001;154(1):95–108.
39. Nakaar V, Ngô HM, Aaronson EP, Coppens I, Stedman TT, Joiner KA. Pleiotropic effect due to targeted depletion of secretory rhoptry protein ROP2 in *Toxoplasma gondii*. 2003;(1).
40. Ahn H, Kim S, Kim H, Nam H. Interactions between secreted GRA proteins and host cell proteins across the parasitophorous vacuolar membrane in the parasitism of *Toxoplasma gondii*. 2006;44(4):303–12.
41. Coppens I, Dunn JD, Romano JD, Pypaert M, Zhang H, Boothroyd JC, et al. *Toxoplasma gondii* Sequesters Lysosomes from Mammalian Hosts in the Vacuolar Space. 2006;261–74.
42. Coppens I. Microreview Contribution of host lipids to *Toxoplasma* pathogenesis. 2006;8(November 2005):1–9.
43. Sehgal A, Bettiol S, Pypaert M, Wenk MR, Kaasch A, Blader IJ, et al. Peculiarities of Host Cholesterol Transport to the Unique Intracellular Vacuole Containing *Toxoplasma*. 2005;(September):1125–41.
44. Coppens I, Joiner KA. Host but Not Parasite Cholesterol Controls *Toxoplasma* Cell Entry by Modulating Organelle Discharge. 2003;14(September):3804–20.
45. Portugal LR, Fernandes LR, Pietra Pedroso VS, Santiago HC, Gazzinelli RT, Alvarez-Leite JI. Influence of low-density lipoprotein (LDL) receptor on lipid composition, inflammation and parasitism during *Toxoplasma gondii* infection. *Microbes Infect.* 2008;
46. Adjogble KDZ, Mercier C, Dubremetz J, Hucke C, Mackenzie CR, Cesbron-delaun M, et al. GRA9 , a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes. 2004;34:1255–64.
47. Mercier C, Sibley LD, Cesbron-delaun M, Fourier J. Biogenesis of Nanotubular Network in *Toxoplasma* Parasitophorous Vacuole Induced by Parasite Proteins. 2002;13(July):2397–409.
48. Kemp LE, Yamamoto M, Soldati-favre D. Subversion of host cellular functions by the apicomplexan parasites parasites. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;37:607–31.
49. Peixoto L, Chen F, Harb OS, Davis PH, Beiting DP, Brownback CS, et al. Integrative genomic approaches highlight a family of parasite-specific kinases that regulate host responses. *Cell Host Microbe.*

- 2010;8(2):208–18.
50. Saeij JPJ, Collier S, Boyle JP, Jerome ME, White MW, Boothroyd JC. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature*. 2007;445(7125):324–7.
  51. Jensen KDC, Wang Y, Wojno EDT, Shastri AJ, Hu K, Boedec E, et al. *Toxoplasma* Polymorphic Effectors Determine Macrophage Polarization and Intestinal Inflammation. 2012;9(6):472–83.
  52. Robben PM, Mordue DG, Truscott SM, Takeda K, Akira S, Sibley LD. Production of IL-12 by Macrophages Infected with *Toxoplasma gondii* Depends on the Parasite Genotype. 2004;
  53. Murphy KM, Ouyang W, Farrar JD, Yang J, Ranganath S, Asnagli H, et al. S IGNALING AND T RANSCRIPTION IN. 2000;451–94.
  54. Jankovic D, Kullberg MC, Feng CG, Goldszmid RS, Collazo CM, Wilson M, et al. are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. 2007;204(2):273–83.
  55. Butcher BA, Fox BA, Rommereim LM, Kim SG, Maurer KJ, Herbert DBR, et al. *Toxoplasma gondii* Rhoptry Kinase ROP16 Activates STAT3 and STAT6 Resulting in Cytokine Inhibition and Arginase-1-Dependent Growth Control. 2011;7(9).
  56. Liesenfeld O, Heimesaat MM. Immunology of *Toxoplasma gondii*. 2011;240:269–85.
  57. Meira CS, Pereira-Chioccia VL, Vidal JE, de Mattos CCB, Motoie G, Costa-Silva TA, et al. Cerebral and ocular toxoplasmosis related with IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-10 levels. *Front Microbiol*. 2014;5(OCT).
  58. Scanga CA, Aliberti J, Jankovic D, Tilloy F, Bennouna S, Denkers EY, et al. Cutting Edge: MyD88 Is Required for Resistance to *Toxoplasma gondii* Infection and Regulates Parasite-Induced IL-12 Production by Dendritic Cells. 2015;
  59. Sher A, Yap G, Aliberti J. Induction and Regulation of IL-12-Dependent Host Resistance to *Toxoplasma gondii*. 2003;521–7.
  60. Gazzinelli RT, Wysocka M, Hieny S, Scharton-Kersten T, Cheever A, Kühn R, Müller W, Trinchieri G SA. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol*. 1996;Jul 15;157(PMID: 8752931.):798–805.

61. Pfefferkorn ER. Interferon  $\gamma$  blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. 1984;81(February):908–12.
62. Hunter CA, Sibley LD. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. 2012;10(November):766–78.
63. Khaminets A, Hunn JP, Könen-waisman S, Zhao YO, Preukschat D, Coers J, et al. Coordinated loading of IRG resistance GTPases on to the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole. 2010;12(March):939–61.
64. Jamieson SE, Peixoto-Rangel AL, Hargrave AC, Roubaix LAD, Mui EJ, Boulter NR, et al. Evidence for associations between the purinergic receptor P2X 7 (P2RX7) and toxoplasmosis. Genes Immun. 2010;11(5):374–83.
65. Gazzinelli RT, Denkers EY. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways : implications for host parasitism. 2006;6(DECEMBER):895–906.
66. Parker SJ, Roberts CW, Alexander J. CD8 + T cells are the major lymphocyte subpopulation involved in the protective immune response to *Toxoplasma gondii* in mice. 1991;207–12.
67. Mordue DG, Sibley LD. Intracellular fate of vacuoles containing *Toxoplasma gondii* is determined at the time of formation and depends on the mechanism of entry. J Immunol [Internet]. 1997;159(9):4452–9. Available from:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9379044%5Cnhttp://www.jimmunol.org/cgi/reprint/159/9/4452.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9379044%5Cnhttp://www.jimmunol.org/cgi/reprint/159/9/4452.pdf)
68. Cong H, Mui EJ, Witola WH, Sidney J, Alexander J, Sette A, et al. *Toxoplasma gondii* HLA-B\*0702-restricted GRA720-28 peptide with adjuvants and a universal helper T cell epitope elicits CD8+ T cells producing interferon- $\gamma$  and reduces parasite burden in HLA-B\*0702 mice. Hum Immunol [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2018 Sep 25];73(1):1–10. Available from:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0198885911005520?via%3Dihub>
69. Scharton-Kersten T, E.Y. Denkers RG, and A. Sher. Role of IL12 in induction of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. Res Immunol. 1995;146:539–45.
70. Ong Y, Reese ML, Boothroyd JC. Toxoplasma Rhoptyr Protein 16 (

- ROP16 ) Subverts Host Function by Direct Tyrosine Phosphorylation of STAT6 \*. 2010;285(37):28731–40.
71. Leykauf K, Treeck M, Gilson PR, Nebl T, Braulke T, Cowman AF, et al. Protein Kinase A Dependent Phosphorylation of Apical Membrane Antigen 1 Plays an Important Role in Erythrocyte Invasion by the Malaria Parasite. 2010;6(6).
  72. (US) SRB, (US) LH V, (US) MRL, (US) HDD. Inactivators of *Toxoplasma gondii* ornithine aminotransferase for treating toxoplasmosis and malaria. 2016.
  73. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative Activation of Macrophages : An Immunologic Functional Perspective. 2009;
  74. Rosowski EE, Lu D, Julien L, Rodda L, Gaiser RA, Jensen KDC, et al. Strain-specific activation of the NF- $\kappa$ B pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein. J Exp Med [Internet]. 2011;208(1):195–212. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20100717>
  75. Llesenfeld BO, Kosekfill J, Remington JS. Association of CD4 + T Cell-dependent, Interferon- $\gamma$ -mediated Necrosis of the Small Intestine with Genetic Susceptibility of Mice to Peroral Infection with *Toxoplasma gondii*. 1996;184(August).
  76. Hajj H El, Lebrun M, Arold ST, Vial H, Labesse G, Dubremetz JF. ROP18 Is a Rhoptry Kinase Controlling the Intracellular Proliferation of *Toxoplasma gondii*. PLoS Pathog. 2007;1–12.
  77. Collie J, Duplisea D, Bravington M, Link J, Kitchell J, Maunder M, et al. A Secreted Serine-Threonine Kinase Determines Virulence in the Eukaryotic Pathogen *Toxoplasma gondii*. 2006;(December):1776–81.
  78. Hunn JP, Koenen-waisman S, Papic N, Schroeder N, Pawlowski N, Lange R, et al. Regulatory interactions between IRG resistance GTPases in the cellular response to *Toxoplasma gondii*. 2008;(June):2495–509.
  79. Krishnamurthy S, Konstantinou EK, Young LH, Gold DA, Saeij JPJ. The human immune response to Toxoplasma: Autophagy versus cell death. Vol. 13, PLoS Pathogens. 2017.
  80. Sarah J. Fentress, Tobias Steinfeldt, Jonathan C. Howard and LDS. The arginine-rich N-terminal domain of ROP18 is necessary for vacuole targeting and virulence of *Toxoplasma gondii*. 2013;14(12):1921–33.
  81. Mariane B. Melo, Kirk D.C. Jensen and JPJS. *Toxoplasma gondii*

- effectors are master regulators of the inflammatory response. 2012;27(11):487–95.
82. Niedelman W, Gold DA, Rosowski EE, Sprockholt JK, Lim D, Arenas AF, et al. The rhoptry proteins ROP18 and ROP5 mediate *Toxoplasma gondii* evasion of the murine, but not the human, interferon-gamma response. PLoS Pathog. 2012;8(6).
  83. Etheridge RD, Alaganan A, Tang K, Lou HJ, Turk BE, Sibley LD. The *Toxoplasma* pseudokinase ROP5 forms complexes with ROP18 and ROP17 kinases that synergize to control acute virulence in mice. 2015;15(5):537–50.
  84. Acosta JA., Hernandez ADL. An Overview of Peripheral Blood Mononuclear Cells as a Model for Immunological Research of *Toxoplasma gondii* and Other Apicomplexan Parasites. Front Cell Infect Microbiol. 2019;9(February):1–10.
  85. Glisic-Milosavljevic S, Waukau J, Jana S, Jailwala P, Rovensky J, Ghosh S. Comparison of apoptosis and mortality measurements in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using multiple methods. Cell Prolif. 2005;38(5):301–11.
  86. Weinberg A, Song LY, Wilkening CL, Fenton T, Hural J, Ferrari G, et al. NIH Public Access. 2011;363(1):42–50.
  87. Bayram Delibaş S, Turgay N, Gürüz AY. The role of cytokines in the immunopathogenesis of toxoplasmosis. Turkiye Klin J Med Sci. 2009;29(5):1217–21.
  88. Cardona NI, Moncada DM, Gómez-Marin JE. A rational approach to select immunogenic peptides that induce IFN- $\gamma$  response against *Toxoplasma gondii* in human leukocytes. Immunobiology [Internet]. 2015 Dec [cited 2018 Sep 26];220(12):1337–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26210043>
  89. Cong H, Mui EJ, Witola WH, Sidney J, Alexander J, Sette A, et al. Towards an immunosense vaccine to prevent toxoplasmosis: Protective *Toxoplasma gondii* epitopes restricted by HLA-A\*0201. Vaccine. 2011;29(4):754–62.
  90. Meira CS, Pereira-Chioccola VL, Vidal JE, Motoie G, da Costa-Silva TA, Gava R, et al. Evolution of cytokine profile during the treatment of cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. J Immunol Methods. 2015;426:14–8.
  91. Prigione I, Chiesa S, Taverna P, Ceccarelli R, Frulio R, Morandi F, et al.



- T cell mediated immune responses to *Toxoplasma gondii* in pregnant women with primary toxoplasmosis. *Microbes Infect.* 2006;8(2):552–60.
92. Alfonzo M, Badell E, Pourcel C, Dumas G, Colle JH, Scott-Algara D. Cell-mediated and not humoral immune response is responsible for partial protection against toxoplasmosis in SCID mice reconstituted with human PBMC. *Inmunologia.* 2005;24(3):273–82.
  93. Maia MM, Meira-Strejevitch CS, Pereira-Chioccola VL, de Hippólito DDC, Silva VO, Brandão de Mattos CC, et al. Evaluation of gene expression levels for cytokines in ocular toxoplasmosis. *Parasite Immunol.* 2017;39(10).
  94. Rezende-oliveira K, Silva NM, Mineo JR, Junior VR. Cytokines and chemokines production by mononuclear cells from parturient women after stimulation with live *Toxoplasma gondii*. *Placenta* [Internet]. 2012;33(9):682–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2012.05.013>
  95. Dzitko K, Ławnicka H, Gatkowska J, Dziadek B, Komorowski J, Długońska H. Inhibitory effect of prolactin on *Toxoplasma* proliferation in peripheral blood mononuclear cells from patients with hyperprolactinemia. *Parasite Immunol.* 2012;34(6):302–11.
  96. Pfaff AW, Georges S, Abou-Bacar A, Letscher-Bru V, Klein J-P, Mousli M, et al. *Toxoplasma gondii* regulates ICAM-1 mediated monocyte adhesion to trophoblasts. *Immunol Cell Biol.* 2005;83(5):483–9.
  97. Tosh KW, Mittereder L, Bonne-Annee S, Hieny S, Nutman TB, Singer SM, et al. The IL-12 Response of Primary Human Dendritic Cells and Monocytes to *Toxoplasma gondii* Is Stimulated by Phagocytosis of Live Parasites Rather Than Host Cell Invasion. *J Immunol* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2018 Sep 26];196(1):345–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26597011>
  98. Tan TG, Mui E, Cong H, Witola WH, Montpetit A, Muench SP, et al. Identification of *T. gondii* epitopes, adjuvants, and host genetic factors that influence protection of mice and humans. *Vaccine* [Internet]. 2010 May 21 [cited 2018 Sep 26];28(23):3977–89. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X10003750?via%3Dihub>
  99. Dzitko K, Grzybowski MM, Pawełczyk J, Dziadek B, Gatkowska J, Stączek P, et al. Phytoecdysteroids as modulators of the *Toxoplasma gondii* growth rate in human and mouse cells. *Parasit Vectors.* 2015;8(1):422.

100. Burczynski ME, Dorner AJ. Transcriptional profiling of peripheral blood cells in clinical pharmacogenomic studies. *Pharmacogenomics*. 2006;7(2):187–202.
101. Corkum CP, Ings DP, Burgess C, Karwowska S, Kroll W, Michalak TI. Immune cell subsets and their gene expression profiles from human PBMC isolated by Vacutainer Cell Preparation Tube (CPT™) and standard density gradient. *BMC Immunol* [Internet]. 2015;16(1):1–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12865-015-0113-0>
102. Wunsch M, Caspell R, Kuerten S, Lehmann P V, Sundararaman S. Serial Measurements of Apoptotic Cell Numbers Provide Better Acceptance Criterion for PBMC Quality than a Single Measurement Prior to the T Cell Assay. *Cells* [Internet]. 2015;4(1):40–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25585298>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4381208>
103. Riedhammer C, Dagmar Halbritter, Weissert R. Peripheral Blood Mononuclear Cells: Isolation, Freezing, Thawing, and Culture. *Methods Mol Biol*. 2016;(1341):257–84.
104. Baust JM. Molecular mechanisms of cellular demise associated with cryopreservation failure. *Cell Preserv Technol*. 2002;1(1):17–31.
105. Cosentino LM, Corwin W, Baust JM, Diaz-Mayoral N, Cooley H, Shao W, et al. Preliminary Report: Evaluation of Storage Conditions and Crycocktails during Peripheral Blood Mononuclear Cell Cryopreservation. *Cell Preserv Technol* [Internet]. 2007;5(4):189–204. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/cpt.2007.9987>
106. Fowke KR, Behnke J, Hanson C, Shea K, Cosentino LM. Apoptosis: A method for evaluating the cryopreservation of whole blood and peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol Methods*. 2000;244(1–2):139–44.
107. Yang J, Diaz N, Adelsberger J, Zhou X, Stevens R, Rupert A, et al. The effects of storage temperature on PBMC gene expression. *BMC Immunol* [Internet]. 2016;17(1):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12865-016-0144-1>
108. Mallone R, Mannering SI, Brooks-Worrell BM, Durinovic-Belló I, Cilio CM, Wong FS, et al. Isolation And Preservation Of Peripheral Blood Mononuclear cells for analysis of islet antigen-reactive T cell responses: Position statement of the T-Cell Workshop Committee of the Immunology of Diabetes Society. Vol. 163, *Clinical and Experimental*

Immunology. 2011. p. 33–49.

109. He JJA, Ma JAB, Song HQA, Zhou DHA, Wang JLA, Huang SYA, et al. Transcriptomic analysis of global changes in cytokine expression in mouse spleens following acute *Toxoplasma gondii* infection. *Parasitol Res* [Internet]. 2015;703–12. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84945297350&partnerID=40&md5=a3ca1c40917cbd430d73c046023d3b99>
110. Zhou CX, Elsheikha HM, Zhou DH, Liu Q, Zhu XQ, Suo X. Dual identification and analysis of differentially expressed transcripts of porcine PK-15 cells and *Toxoplasma gondii* during in vitro infection. *Front Microbiol*. 2016;7(MAY):1–13.
111. Wisniewski SR, Leon AC, Otto MW, Trivedi MH. Prevention of Missing Data in Clinical Research Studies. *Biological Psychiatry*. 2006.
112. Safronova A, Araujo A, Camanzo ET, Moon TJ, Elliott MR, Beiting DP, et al. Alarmin S100A11 initiates a chemokine response to the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Nat Immunol* [Internet]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41590-018-0250-8>
113. Pittman KJ, Aliota MT, Knoll LJ. Dual transcriptional profiling of mice and *Toxoplasma gondii* during acute and chronic infection. *BMC Genomics* [Internet]. 2014;15(1):806. Available from: <http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-15-806>
114. Tanaka S, Nishimura M, Ihara F, Yamagishi J, Suzuki Y, Nishikawa Y. Transcriptome analysis of mouse brain infected with *toxoplasma gondii*. *Infect Immun*. 2013;81(10):3609–19.
115. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Moser K, Ortmann WA, et al. Expression levels for many genes in human peripheral blood cells are highly sensitive to ex vivo incubation. *Genes Immun*. 2004;5(5):347–53.
116. Westermann AJ, Barquist L, Vogel J. Resolving host–pathogen interactions by dual RNA-seq. *PLoS Pathog*. 2017;13(2):1–19.
117. de-la-Torre A, Sauer A, Pfaff AW, Bourcier T, Brunet J, Speeg-Schatz C, et al. Severe South American Ocular Toxoplasmosis Is Associated with Decreased Ifn- $\gamma$ /Il-17a and Increased Il-6/Il-13 Intraocular Levels. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(11).
118. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW, Instrumentation C. NIH Image

- to ImageJ : 25 years of Image Analysis. 2017;9(7):671–5.
119. Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ, Robert D, Harmer DW, et al. GAPDH as a housekeeping gene : analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. 2005;389–95.
  120. Chiabchalard R, Wiengcharoen JT SY. Sensitivity and specificity of polymerase chain reaction for the detection of *Toxoplasma gondii* DNA added to laboratory samples. Southeast Asian J Trop Med Public Heal. 2005;36(2)(2):408–11 PMID: 15916047.
  121. Zhou C-X, Zhou D-H, Liu G-X, Suo X, Zhu X-Q. Transcriptomic analysis of porcine PBMCs infected with *Toxoplasma gondii* RH strain. Acta Trop. 2016;154:82–8.
  122. Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. TopHat2: Accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. Genome Biol. 2013;14(4).
  123. Trapnell C, Hendrickson DG, Sauvageau M, Goff L, Rinn JL, Pachter L. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. Nat Biotechnol. 2013;31(1):46–53.
  124. Kissinger JC, Gajria B, Li L, Paulsen IT, Roos DS. ToxoDB : accessing the *Toxoplasma gondii* genome. 2003;31(1):234–6.
  125. Gajria B, Bahl A, Brestelli J, Dommer J, Fischer S, Gao X, et al. ToxoDB: An integrated *toxoplasma gondii* database resource. Nucleic Acids Res. 2008;36(SUPPL. 1).
  126. Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV, et al. Enrichr : interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. 2013;
  127. Jassal B, Matthews L, Viteri G, Gong C, Lorente P, Fabregat A, et al. The reactome pathway knowledgebase. 2020;48(November 2019):498–503.
  128. Peterson H, Kolberg L, Kuzmin I, Arak T, Adler P. g : Profiler : a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists ( 2019 update ). 2019;1–8.
  129. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-cepas J, et al. STRING v11 : protein – protein association networks with increased coverage , supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. 2019;47(November 2018):607–13.
  130. Halonen SK. Use of Human Neurons Derived via Cellular

Reprogramming Methods to Study Host-Parasite Interactions of *Toxoplasma gondii* in Neurons. 2017;

131. Szabo EK, Finney CAM. *Toxoplasma gondii*: One Organism, Multiple Models. Trends Parasitol [Internet]. 2017;33(2):113–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2016.11.007>
132. Channon JYJ, Seguin RMR, Kasper LLH. Differential Infectivity and Division of *Toxoplasma gondii* in Human Peripheral Blood Leukocytes. Infect Immun [Internet]. 2000;68(8):4822–6. Available from: <http://iai.asm.org/content/68/8/4822.short>
133. Meira-Strejevitch CS, Pereira-Chiocola VL, Maia MM, de Hippolito DDC, Wang H-TL, Motoie G, et al. Reference genes for studies in infectious parasitic diseases in five types of human tissues. Gene Reports [Internet]. 2017;7:98–105. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S245201441730016X>
134. Wei Z, Batagov AO, Carter DRF, Krichevsky AM. Fetal Bovine Serum RNA Interferes with the Cell Culture derived Extracellular RNA. Nat Publ Gr [Internet]. 2016;1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep31175>
135. Autissier P, Soulas C, Burdo TH, Williams KC. Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. Cytom Part A. 2010;77(5):410–9.
136. Pifer R, Yarovinsky F. Innate responses to *Toxoplasma gondii* in mice and humans. Trends Parasitol [Internet]. 2011;27(9):388–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2011.03.009>
137. Hernández-de-los-ríos A, Murillo-leon M, Mantilla-muriel LE, Arenas AF, Vargas-montes M, Cardona N. Influence of Two Major *Toxoplasma gondii* Virulence Factors ( ROP16 and ROP18 ) on the Immune Response of Peripheral Blood Mononuclear Cells to Human Toxoplasmosis Infection. 2019;9(December):1–11.
138. Niedelman W, Sprokholt JK, Clough B, Frickel E, Saeij JPJ. Cell Death of Gamma Interferon-Stimulated Human Fibroblasts upon *Toxoplasma gondii* Infection Induces Early Parasite Egress and Limits. 2013;81(12):4341–9.
139. Xie J, Tato CM, Davis MM. How the immune system talks to itself: the varied role of synapses. 2014;251(1):65–79.
140. Stephen N, Sanderson R, Puntel M, Kroeger KM, Bondale NS, Swerdlow M. Cytotoxic immunological synapses do not restrict the

- action of interferon-  $\gamma$  to antigenic target cells. 2012;109(20):7835–40.
141. Nandakumar R, Tschisnarov R, Meissner F, Prabakaran T, Krissanaprasit A, Farahani E, et al. Intracellular bacteria engage a STING-TBK1-MVB12b pathway to enable paracrine cGAS-STING signaling. Vol. 4. 2019. 701-713 p.
  142. Wang M, Zhang F, Elsheikha HM, Zhang N, He J, Luo J. Transcriptomic insights into the early host- pathogen interaction of cat intestine with *Toxoplasma gondii*. 2018;1–17.
  143. Fisch D, Clough B, Frickel E. Human immunity to *Toxoplasma gondii*. 2019;1:6–12.
  144. Swierzy IJ, Händ U, Kaefer A, Jarek M, Scharfe M, Lüder CGK. Divergent co-transcriptomes of different host cells infected with *Toxoplasma gondii* reveal cell interactions. 2017;(February):1–14.
  145. Dutta B, Snyder R, Klapa MI. Significance Analysis of Time-Series Transcriptomic Data : A Methodology That Enables the Identification and Further Exploration of the Differentially Expressed Genes at Each Time-Point. 2007;98(3):668–78.
  146. Saeij JP, Frickel E. Exposing *Toxoplasma gondii* hiding inside the vacuole : a role for GBPs , autophagy and host cell death. Curr Opin Microbiol [Internet]. 2017;40:72–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2017.10.021>
  147. White MW, Suvorova ES. Apicomplexa Cell Cycles : Something Old , Borrowed , Lost , and New. 2018;34(9):759–71.
  148. Black MW, Boothroyd JC. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. Microbiol Mol Biol Rev [Internet]. 2000;64(3):607–23. Available from: <http://mmbbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.64.3.607-623.2000>
  149. Croken MM, Ma Y, Markillie LM, Taylor RC, Orr G, Weiss LM, et al. Distinct strains of *Toxoplasma gondii* feature divergent transcriptomes regardless of developmental stage. PLoS One. 2014;9(11):1–10.
  150. Zellmer S, Schmidt-heck W, Godoy P, Weng H, Meyer C, Lehmann T, et al. Transcription Factors ETF, E2F, and SP-1 Are Involved in Cytokine-Independent Proliferation of Murine Hepatocytes. 2010;(Exc 294):2127–36.
  151. Wang Y, Hu J, Li Y, Xiao M, Wang H, Tian Q. The Transcription Factor TCF1 Preserves the Effector Function of Exhausted CD8 T Cells During Chronic Viral Infection. 2019;10(February):1–14.

152. Cui J, Shen B. Transcriptomic analyses reveal distinct response of porcine macrophages to *Toxoplasma gondii* infection. 2020;1819–28.
153. Gómez M. J.E. No NO Production During Human. 2000;(1998):4758.
154. Lüder CGK, Algner M, Lang C, Bleicher N, Gro U. Reduced expression of the inducible nitric oxide synthase after infection with *Toxoplasma gondii* facilitates parasite replication in activated murine macrophages. 2003;33:833–44.
155. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells : the sentinels of the immune system. Nat Publ Gr [Internet]. 2010;10(jULy). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2800>
156. Torres E, Laura M, Nestor T, De A, Juan T, Sepulveda C, et al. Th1 and Th2 immune response to P30 and ROP18 peptides in human toxoplasmosis. 2014;
157. Cordeiro CA, Moreira PR, Andrade MS, Dutra WO, Campos WR, Orfice F, et al. Interleukin-10 gene polymorphism (-1082G/A) is associated with toxoplasmic retinochoroiditis. Investig Ophthalmol Vis Sci. 2008;49(5):1979–82.
158. He H, Braun L, Kraut A, Tardieux I, Hakimi M, Touquet B, et al. Characterization of a *Toxoplasma* effector uncovers an alternative GSK3 /  $\beta$ -catenin- regulatory pathway of inflammation. 2018;1–28.
159. Shapira S, Harb OS, Margarit J, Matrajt M, Han J, Hoffmann A, et al. Initiation and termination of NF- $\kappa$ B signaling by the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. 2005;
160. Alaganan A, Fentress SJ, Tang K, Wang Q, Sibley LD. *Toxoplasma* GRA7 effector increases turnover of immunity-related GTPases and contributes to acute virulence in the mouse. 2014;111(3):1126–31.
161. Wang J, Li T, Elsheikha HM, Chen K, Zhu W, Yue D, et al. Functional Characterization of Rhoptry Kinome in the Virulent *Toxoplasma gondii* RH Strain. 2017;8(January):1–8.

**ANEXOS****ANEXO 1**

**Artículo publicado 1:** *Acosta Davila JA and Hernandez De Los Rios A (2019). An Overview of Peripheral Blood Mononuclear Cells as a Model for Immunological Research of Toxoplasma gondii and Other Apicomplexan Parasites. Front. Cell. Infect. Microbiol. 9:24. doi: 10.3389/fcimb.2019.00024.*



# **An Overview of Peripheral Blood Mononuclear Cells as a Model for Immunological Research of *Toxoplasma gondii* and Other Apicomplexan Parasites**

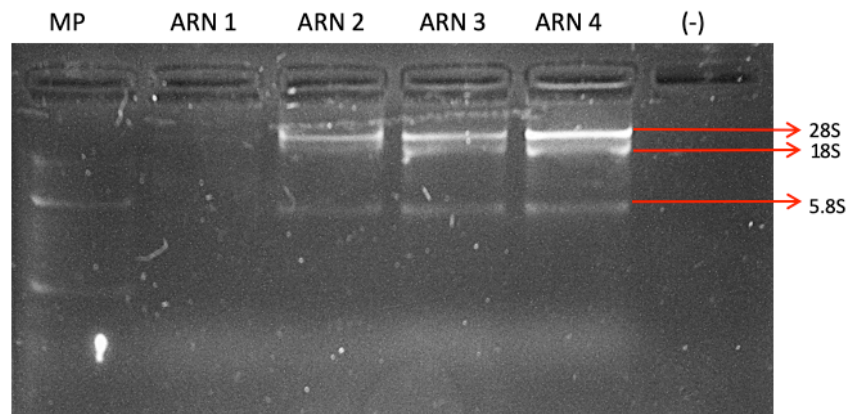
*John Alejandro Acosta Davila\* and Alejandro Hernandez De Los Rios*

GEPI/MCL, Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia



## ANEXO 2

Extracción y visualización de ARN Total del modelo de PBMCs humanos infectados con *Toxoplasma gondii*



ARN Total en gel de agarosa al 1%. MP: Marcador de Peso Molecular.

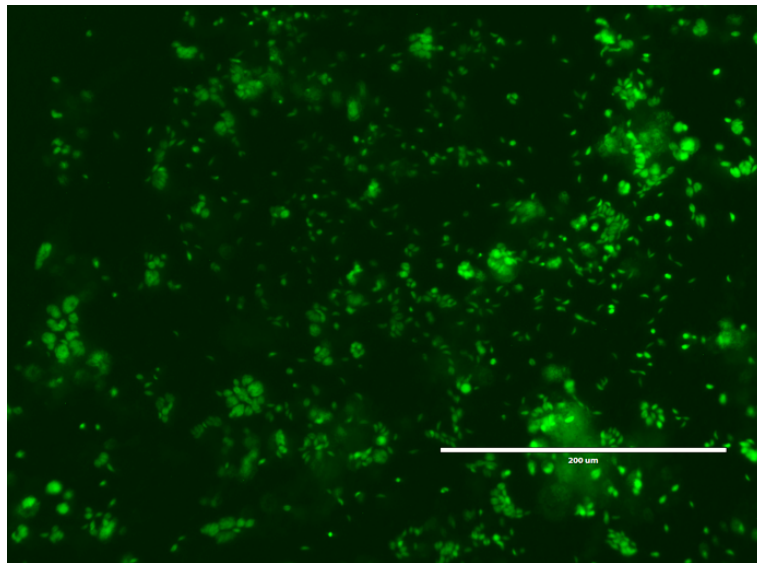
**ARN1:** ARN total 0 horas RH de *T. gondii*. **ARN 2:** ARN total 0 horas PBMCs Humanos. **ARN 3:** ARN total 1 hora post-infección. **ARN 4:** ARN total 6 horas post-infección. **(-):** Control negativo.

### ANEXO 3

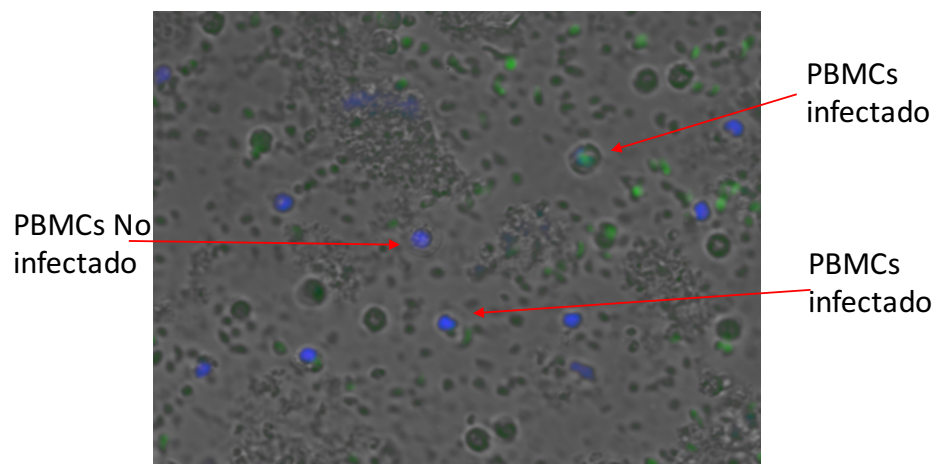
Cuantificación de ARN total del modelo de infección ex vivo en PBMCs infectados con *T. gondii*.

	1	2	R 260/280
A	0.02	0.019	260
	0.01	0.009	280
	<b>2.047</b>	<b>2.127</b>	260/280
	15.645	15.354	ng/ $\mu$ L
B	0.018	0.02	260
	0.009	0.01	280
	<b>2.147</b>	<b>1.955</b>	260/280
	14.672	15.788	ng/ $\mu$ L
C	0.047	0.046	260
	0.022	0.022	280
	<b>2.125</b>	<b>2.119</b>	260/280
	37.616	36.466	ng/ $\mu$ L
D	0.053	0.052	260
	0.026	0.025	280
	<b>2.097</b>	<b>2.12</b>	260/280
	42.782	41.983	ng/ $\mu$ L
E	0.053	0.053	260
	0.024	0.025	280
	<b>2.162</b>	<b>2.163</b>	260/280
	42.093	42.701	ng/ $\mu$ L
F	0.06	0.058	260
	0.027	0.026	280
	<b>2.194</b>	<b>2.249</b>	260/280
	47.997	46.389	ng/ $\mu$ L
G	0.075	0.075	260
	0.035	0.035	280
	<b>2.117</b>	<b>2.142</b>	260/280
	59.632	60.181	ng/ $\mu$ L
H	0.071	0.073	260
	0.033	0.034	280
	<b>2.173</b>	<b>2.172</b>	260/280
	56.619	58.3	ng/ $\mu$ L

Cuantificación del ARN total: **A y B**: 0 horas de *T. gondii*; **C y D**: 0 horas de los PBMCs humanos; **E y F**: 1 hora post-infección; **G y H**: 6 horas post-infección. **1 y 2**: primera y segunda replica respectivamente.

**ANEXO 4**

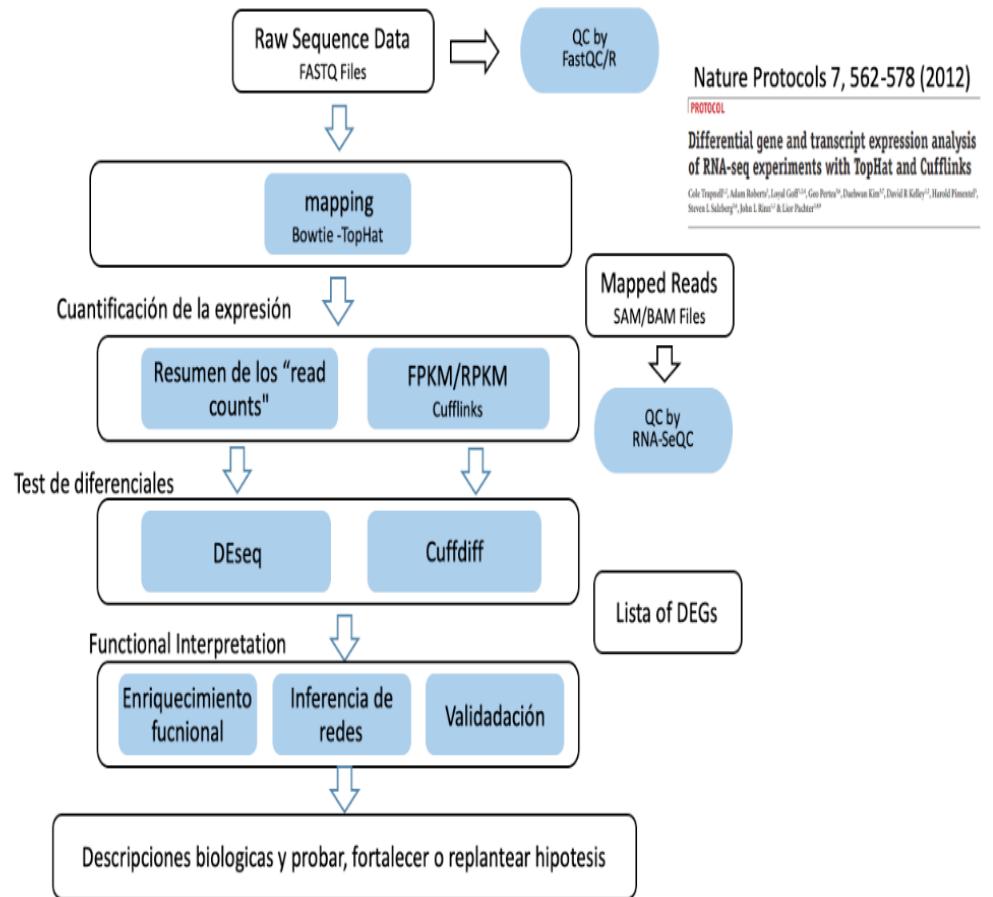
Crecimiento y proliferación de *Toxoplasma gondii* RH-GFP en cultivo celular de células HFF.

**ANEXO 5**

Inmunofluorescencia de la infección por *T. gondii* RH-GFP a PBMC humanas en un modelo en condiciones ex vivo (Multiplicidad de infección 1:5), microscopio de fluorescencia con un zoom óptico de 20X.

**ANEXO 6:** Diagrama general de la metodología utilizada en análisis de mapeo y generación de genes diferencialmente expresados DEGs.

## Computational analysis



**ANEXO 7.** Resultados consolidados del proceso RNA-seq y del mapeo con valores de calidad de cada una de las muestras.

Sample name	Raw reads	Clean reads	Raw bases	Clean bases	Error rate(%)	Q20(%)	Q30(%)	GC content(%)
<b>A16</b>	65559124	63696124	9.8G	9.6G	0.03	97.87	94.07	50.17
<b>A1</b>	54105610	52390402	8.1G	7.9G	0.03	97.86	94.07	49.81
<b>A21</b>	45038540	43976542	6.8G	6.6G	0.03	97.94	94.16	50.27
<b>A22</b>	54961832	52425932	8.2G	7.9G	0.02	98.12	94.6	52.56
<b>A24</b>	40373812	38818102	6.1G	5.8G	0.02	98.1	94.55	52.14
<b>A26</b>	62965870	59700672	9.4G	9G	0.03	97.94	94.17	49.65
<b>A28</b>	64082700	62535106	9.6G	9.4G	0.02	98.04	94.47	52.01
<b>A29</b>	43807512	42855654	6.6G	6.4G	0.02	98.1	94.52	52.38
<b>A2</b>	53815690	52910416	8.1G	7.9G	0.02	98.26	94.89	52.37
<b>A30</b>	52680774	50142176	7.9G	7.5G	0.02	98.17	94.77	51.93
<b>A31</b>	60924662	59624220	9.1G	8.9G	0.03	97.96	94.18	50.15
<b>A33</b>	52341534	51079532	7.9G	7.7G	0.03	97.81	93.83	52.01
<b>A34</b>	44604954	43108384	6.7G	6.5G	0.02	98.08	94.5	52.19
<b>A36</b>	53444106	51768540	8G	7.8G	0.03	97.79	93.78	49.66
<b>A38</b>	41133322	40297586	6.2G	6G	0.03	97.97	94.21	51.73
<b>A39</b>	51689266	48630836	7.8G	7.3G	0.02	98.11	94.57	51.41
<b>A3</b>	43709024	42427972	6.6G	6.4G	0.02	98.11	94.54	51.05
<b>A40</b>	61055246	54475556	9.2G	8.2G	0.03	97.63	93.59	50.99
<b>A41</b>	44019116	42633082	6.6G	6.4G	0.03	97.96	94.24	50.02
<b>A42</b>	48636626	46816264	7.3G	7G	0.02	98.01	94.29	51.24
<b>A4</b>	54284470	52454136	8.1G	7.9G	0.02	98.06	94.44	51.34
<b>A5</b>	54211752	51700252	8.1G	7.8G	0.03	97.93	94.24	51.06
<b>A6</b>	41971136	40581742	6.3G	6.1G	0.03	97.95	94.17	49.8
<b>Con RH</b>	41712702	41200782	6.3G	6.2G	0.02	98.16	94.64	54.54
<b>A32</b>	42634630	41453188	6.4G	6.2G	0.02	98.02	94.34	52.06
<b>A9</b>	68706984	67187722	10.3G	10.1G	0.03	98.01	94.21	51.68
<b>A10</b>	43462066	40221944	6.5G	6G	0.03	97.91	94.18	52.86
<b>Media</b>	51330854.1	49448624.6			0.02518519	97.9951852	94.3044444	51.3733333

## ANEXO 8

Lista de DEGs (542) compartidos en CRO/NEG en la dinámica 1 vs 6 horas pi.

542 DEGs compartidos en CRO y NEG en la dinámica 1 vs 6 horas pi									
ABCA1	BTBD3	COPA	FAM222A	IGFBP3	LYZ	NFKBID	PLXDC2	RRM2B	TSEN54
ABCA2	BYSL	COPRS	FBP1	IL18	MAD2L2	NFKBIZ	PM20D2	RRP1	TSPAN13
ABCG1	C17orf58	CPEB2	FCGRT	IL1A	MAFB	NKD1	PMEP1	RRP9	TSPYL2
ABL1	C1orf109	CPEB4	FCN1	IL1R2	MAFF	NLRP3	PN01	RRS1	TLL12
ACOD1	C1orf216	CPVL	FFAR2	IL2RA	MAOA	NME1	PNPLA1	S100A4	TUBA1B
ACVR1B	C3AR1	CREG1	FKBP4	IL36G	MAP2K3	NOB1	PNPLA8	SC5D	TUBA1C
ADA	C5AR1	CREM	FLJ46875	IQSEC1	MAP3K2	NOD2	POLD2	SCARB1	TWNK
ADA2	C9orf47	CSF1R	FLVCR2	IRAK2	MAP4	NR4A1	POLR2H	SCD	TXN
ADRB2	C9orf72	CSF3R	FOS	IRF2	MCM2	NR4A2	POLR3E	SDC2	TXNRD1
AFF3	CABLES1	CSTB	FOSB	ITGA5	MCM3	NR4A3	PPA1	SEC14L2	UAP1
AK4	CAD	CTSS	FOSL2	ITGAM	MCM4	NRIP3	PPAT	SEH1L	UBL4A
ALCAM	CAMP	CXCL16	FPR1	ITGB2	MCRIP2	NRP1	PPFIBP1	SELENOK	UBR1
ALDH1A2	CBFA2T3	CXCL2	FSD1L	ITGB8	MDFC	NRP2	PPP1R14B	SEMA3C	UNG
ALDH1B1	CBR1	CXCL3	GOS2	ITPRIP	MED14	NUDCD1	PRDX1	SEPTIN10	USP11
ALDH2	CCDC86	CXCL5	GADD45G	IVNS1ABP	MEF2D	OBSCN	PRDX4	SESN3	USP36
AMPD2	CCL20	CYP1B1	GART	JAG1	MET	OGDH	PRKAR2B	SETD1B	USP9X
ANP32A	CCL22	DCTPP1	GASK1B	JMY	METRNL	OLR1	PRMT1	SGK1	UTP14A
APOBEC3A	CCL4L1	DDX3Y	GCH1	JOSD1	MGLL	OR2B11	PRMT3	SGPP2	VAT1
APOBR	CCR4	DENND3	GCKR	KDM6B, TMEM88	MGST1	OSBPL10	PRMT5	SIGMAR1	VCAN
AQP3	CCR6	DHCR24	GCSH	KLF13	MIR155	OSM	PSMB5	SIK1B	VEGFB
AREG	CCRL2	DKC1	GEM	KNOP1	MIR4697HG	OTUD1	PSMG1	SIPA1	VPS13B
ARHGEF7	CD151	DNAJA4	GGCT	LAMB3	MITF	OXR1	PTGR1	SIRPB1	VPS37B
ARL5B	CD274	DNAJC25	GNB4	LAMP3	MKNK2	P2RX1	PTGS1	SKI	WDR12
ARNTL2	CD300E	DNPH1	GNG7	LARS1	MLC1	PA2G4	PTX3	SKIL	WDR3
ARRDC5	CD300LB	DOCK2	GPR132	LFNG	MMP1	PACC1	PUS7	SLC11A1	WDR47
ASGR2	CD320	DPH2	GPT2	LIF	MMP14	PAICS	PVR	SLC12A7	WDR76
ASTL	CD36	DPYD	GRAMD4	LIMA1	MMS22L	PAK3	PYCR1	SLC16A7	WEE1

ATAD3A	CD4	DPYSL3	GRASP	LINC00346	MN1	PARD6G	RAB40C	SLC25A1	WNT11
ATG4C	CD55	DUSP1	GRK3	LIPN	MPEG1	PCNT	RABEPK	SLC25A43	WNT5A
ATIC	CD79A	DUSP6	GSR	LMNA	MPP6	PDCD5	RALGAP1	SLC27A4	XYLT2
ATL3	CD93	DYNC1H1	H2BC21	LOC100128059	MPZL1	PDE4A	RANBP2	SLC29A1	YIF1A
ATN1	CDCA7	DZANK1	HBEGF	LOC105369313	MREG	PDE4B	RAP1GAP2	SLC2A3	YPEL5
ATP1B3	CDK14	E2F7	HCAR2	LOC105373386	MRPL12	PDE4D	RAP2B	SLC35D1	ZDHHC11B
ATP2B1	CDK17	EBI3	HCAR3	LOC105374382	MRPS34	PDGFB	RARA	SLC37A2	ZFP36
ATP8B4	CDK4	EBNA1BP2	HDAC2	LOC107984316	MRT04	PDGFC	RASGEF1B	SLC38A5	ZHX2
AUTS2	CDT1	EDN1	HECTD1	LOC107985734	MS4A6A	PDIA5	RBKS	SLC39A14	ZMYND19
B3GNT5	CEMIP2	EGR3	HES4	LOC107987251	MSH2	PER1	RBM38	SLC41A2	ZNF10
B3GNT7	CENPC	EHF	HEXIM1	LPL	MSMO1	PGAP1	RCN1	SLC43A1	ZNF143
B4GALT2	CENPX	ELL2	HGSNAT	LRFN4	MSR1	PGD	RCOR1	SLC7A11	ZNF185
BATF	CFP	EMP1	HIP1R	LRP1	MTAP	PHLDB3	RELT	SLC7A5	ZNF331
BATF3	CHAC1	ENKD1	HK3	LRP11	MTMR6	PIK3C2B	RGL1	SMAD7	ZNF593
BCAS3	CHMP1B	EPAS1	HLA-B	LRP3	MUCL1	PKP4	RGS1	SNAI1	ZNRF1
BCL2L1	CISH	EPHA4	HLA-C	LRP8	MXD1	PLAUR	RGS2	SPAG5	ZSWIM6
BCL9L	CLEC4A	ESYT2	HLA-DRA	LRRC32	MYO1E	PLCB2	RHOBTB3	SPIB	
BCOR	CLN6	EXOC4	HLA-DRB3	LRRC8D	MYRF	PLD1	RNF125	SPINT1	
BICDL1	CMIP	EXOSC5	HPRT1	LRRK2	NCR3LG1	PLD6	RNF19B	SPON2	
BIVM	CMTM8	F13A1	HPSE	LSR	NDRG1	PLEKHA2	RPIA	SPRED1	
BMP8A	CNOT6L	FABP5	HSPA1A	LTRB	NDUFAF2	PLEKHM1P1	RPS26P25	SPTAN1	
BOP1	COA7	FADS3	HSPA7	LY86	NETO2	PLK2	RRAD	SQLE	
BTBD11	COL1A1	FAM153A	IFRD2	LYPD3	NFAM1	PLK3	RRAGD	SRA1	



## ANEXO 10

Lista de 613 DEGs exclusivos en NEG en la dinámica 1 vs 6 horas pi.

613 DEGs exclusivos en NEG en la dinámica 1 vs 6 horas pi (Foldchange ≥ 2)												
AATK	BTAF1	CNNM4	FAM214B	GPD2	JAKMIP2	LZTS3	NETO1	PHF20	RABL2A	SIK2	TMEM101	ZBTB7B
ABCC3	BZW2	CNOT2	FANCD2	GPR160	JAZF1	MACC1	NFATC1	PHLDA1	RAPGEF2	SLAMF6	TMEM144	ZDHH14
ABLIM3	C11orf95	COL6A2	FASN	GPR180	JMID1C	MACO1	NHP2	PHLDB1	RASSF2	SLC12A2	TMEM175	ZDHH16
ACCS	C19orf38	CPD	FBXL19	GPSM2	JUP	MAD1L1	NIPAL3	PIGY	RBP7	SLC1A4	TMEM192	ZEB1
ACHE	C1QTNF1	CR1	FBXO10	GPT	KANSL1	MAL	NIPSNAP1	PIK3C2A	RCAN2	SLC22A17	TMEM218	ZFC3H1
ACOT7	C2CD4B	CREBBP	FBXW7	GPX1	KCNE3	MAMLD1	NLRP1	PIK3R2	RELL1	SLC22A23	TMEM35B	ZFPM1
ADAM19	C3	CRIP1	FCER1G	GPX3	KCNJ2	MANBA	NLRP12	PITPNM2	RETREG1	SLC25A42	TMEM9	ZMIZ1
ADAM28	C4orf33	CRISP3	FCGR2B	HAS1	KCNQ1	MAP3K8	NOCT	PLAU	REXO2	SLC25A45	TMIGD2	ZNF133
ADM	C6orf223	CRISPLD2	FCRL1	HAVCR2	KCTD12	MARCKS	NONOP2	PLCG2	RGS13	SLC2A5	TNFRSF18	ZNF154
ADORA2B	CA13	CRYBG1	FCRL2	HBA1	KDM4B	MARCKSL1	NOTCH2	PLD4	RGS14	SLC38A3	TNFRSF21	ZNF266
AGO2	CARD9	CSF1	FCRL3	HBA2	KHK	MBD3	NQO1	PLGRKT	RHBD2	SLC43A2	TNFSF8	ZNF335
AHCY	CARN51	CSRNP1	FCRLB	HBB	KIAA0753	MBOAT1	NR1D2	PLIN2	RIC3	SLC50A1	TNNT1	ZNF544
AK5	CASP9	CST3	FGD4	HDAC11	KIAA1324L	ME3	NRCAM	PLPPR2	RILPL2	SLC9A1	TOB1	ZNF683
AKAP12	CAVIN2	CTB-4116.1	FGFR1	HDAC9	KIFC3	MEFV	NRGN	PLXDC1	RIN2	SLC9A7P1	TOGARAM2	ZNF696
AKR1C1	CCDC124	CTH	FGFR1L	HDDC2	KIR2DS1	MICA	NRIP1	PLXNA1	RNASET2	SLCO4C1	TOP2A	ZSWIM9
ALDH1A1	CCDC163	CTSC	FHL1	HDGFL3	KIT	MICAL2	NSMF	PNP	RND1	SLFN11	TOX2	
ALOX5	CCDC167	CTSL	FLNB	HDHD5	KLF3	MICAL2	NUMBL	PNPT1	ROBO3	SMCHD1	TPPP3	
ALS2CL	CCDC18-AS1	CUTALP	FLT1	HELZ	KLHL3	MIDN	NUP58	POLD1	RPL13P12	SNRPD1	TREM2	
AMY2B,RNP	CCDC57	CYB561	FMNL2	HERC5	KRT72,KRT73	MILR1	NUP98	POMGNT1	RPL9P29	SNX29	TRIM24	
ANKRD36	CCDC85B	CYBB	FNDC3A	HID1	KRT86	MMP7	NXF1	PPBP	RRBP1	SPAG9	TRPS1	
ANO9	CCDC93	CYP27A1	FPR2	HIVEP1	LAYN	MNDA	OAS1	PPFIBP2	RRM1	SPARC	TSEN15	
AP1AR	CCL1	CYP4F3	FRMD4B	HLA-DRB1	LEF1	MOB3B	OAS2	PPP5C	RRM2	SPATA20	TSPAN17	
APOL1	CCL19	DAD1	FRMPD3	HLA-E	LENG8	MPO	OAS3	PRC1	RSAD2	SPATA9	TSPAN32	
ARHGAP26	CCL23	DCXR	FUT8	HMG1B1P5	LGALS12	MPP1	OTUD3	PRIMPOL	S100A12	SPI1	TSPAN4	
ARHGAP35	CCL24	DDIT4	FYB1	HNRNP1	LGMN	MRAS	OXCT1	PRKAR2A	S100A2	SPTBN1	TSTD2	
ARL2,SNX15	CCL7	DDX60	GABARAPL1	ICA1	LINC-PINT	MRPL15	PABPC1L	PRKCA	S100A6	SRFBP1	TTC3	
ARRDC3	CCND2	DHCR7	GABBR1	ICOSLG	LINC00515	MRPL3	PAK1	PRKCB	S100A8	SRP14-AS1	TTYT15	
ASB13	CCNT1	DIP2A	GALC	IDO1	LINC00659	MRPL52	PALD1	PRKCE	S100A9	SSH2	TUBA4A	
ATAD2B	CD244	DMTN	GALNT11	IFI44	LINC00926	MRPS23	PAOX	PRMT9	SAT1	SSTR3	TUFT1	
ATG2A	CD5	DOK2	GALNT3	IFIT1	LINC01504	MRPS28	PAQR8	PSAT1	SAV1	STK40	TXK	
ATG9A	CDA	DOP1B	GARS-DT	IFIT3	LINC02273	MS4A1	PARP15	PSME4	SCPEP1	TN1	TYROBP	
ATP2B4	CDC45	DPAGT1	GAS2L1	IFNGR2	LLGL2	MS4A7	PARVG	PSPH	SDHAF3	STOML2	UBE2O	
ATXN10	CDS1	DPYSL4	GBF1	IFRD1	LOC1002943	MVB12A	PCBP3	PSPHP1	SDK2	STX5	UBN2	
ATXN7	CE51	DTD2	GBP1	IGHA1	LOC1019298	MXRA8	PCSK5	PTAFR	SEC14L1	SURF4	USP18	
B3GALT6	CHD1	DTHD1	GDPD5	IGHA1	LOC1027239	MYADM	PDCD2L	PTCRA	SEC23B	SYNJ2	USP21	
B3GAT3	CHD2	DTYMK	GF1B	IGSF9B	LOC1027241	MYBL2	PDE7A	PTDSS2	SEC31B	SYTL1	UVSSA	
B4GALT1	CHRM3-AS2	DUSP23	GFOD2	IL13RA1	LOC1053702	MYEF2	PDLIM1	PTGDR	SERPINA1	TACC1	VEGFA	
B4GAT1	CKAP4	DYSF	GIMAP2	IL17RB	LOC1053733	MYO10	PDLIM7	PTGES	SERPINB8	TAPT1	VSIG1	
BAALC	CKLF	ECE1	GJB6	IL1R1	LOC1053744	NAGLU	PDP1	PTP4A1	SERPINB9	TBC1D27P	WDR43	
BACH2	CLASP2	ECHS1	GK5	IL1RAP	LOC1053766	NAP1L4	PDXP	PTPN7	SESTD1	TCEAL4	WDR77	
BANK1	CLEC10A	EMD	GLRX5	INPP5K	LOC1053777	NAXE	PELI2	PTPRM	SFXN3	TCN2	WDR91	
BAX	CLEC4E	EP300	GNA11	IRGQ	LOC1079873	NBPF26	PELI3	PTRH2	SGMS2	TCP11L2	WDYHV1	
BLK	CLEC5A	EPB41L3	GNA15	IRS2	LOC653303	NCAM1	PER2	PUM3	SH2B3	TCTEX1D2,T	WNT10A	
BLVRB	CLEC7A	EPPK1	GNB5	ISOC2	LOC729218	NCF1C	PERP	PVT1	SH2D2A	TENT4B	WWC3	
BMPRI1A	CLGN	ETV3	GNG8	ITGA2B	LRFN3	NDUFAF8	PES1	PWWP3A	SH2D3A	TFB2M	YES1	
BOLA2B	CLU	EXOSC4	GNPDA1	ITGA6	LRR8C8	NECTIN1	PF4	PXN	SH3BP1	TGFBR3	YPEL4	
BRAF	CLYBL	EXT1	GOLGA8B	ITGAX	LTBP4	NEDD4L	PFKB2	PYHIN1	SH3TC1	THRA	YTHDC1	
BRIX1	CMPK2	EZR	GP1BB,SEPT	ITGB5	LTF	NEDD9	PGPEP1	RAB29	SIGIRR	TIGIT	ZBED3	
BST1	CMTM5	F3	GPAT3	ITPKB	LTK	NEIL1	PHB	RAB43P1	SIGLEC14	TLR2	ZBTB21	
BST2	CNN2	FAM177A1	GPCPD1	JAKMIP1	LYPD2	NEK6	PHF1	RAB44	SIGLEC9	TLR7	ZBTB43	



ANEXO 11. Lista de 1287 DEG sen CRO en la dinámica 0 vs 6 horas pi.

1287 DEG enclavados en CRO en la dinámica 1 vs 6 horas pi (Foldchange ≥ 2)													
AAGAB	CLGN	SGT2	LOC102786126	PANPA	SLC16A5	IRF6	ICR3A	ELG8	SNCA5	MIR556	RAB30	TFPI	
AAY1	CLG2	SP8A	LOC102786126	PRP2	SLC1A5	HIT1B	BR2	ELCV16	NR2G1	MSH6	RAB24	TFPI	
AARS1	CLG4	SPC3	LOC102786939	PCBD1	SLC22A1	UCP2	BD1	EM8	KNP2	MSR4	RAD1	THAP3	
AATBC	CLSRN	SP1	LOC102786991	PGCF6	SLC22A4	UCP2	BTEP1	EMC2	KNK5	MSR3	RAD51B	THAP4	
ABC86	CLUH	SPN3	LOC1027987462	PCNA	SLC25A22	UGDH	BR2	EMTPD4	KNM1A	MTHFD1L	RALA	THS1	
ABC87	CMUKR1	SPNMB	LOC1027987475	PCOD11	SLC25A4	UGT8	BT803	EMF65	KNM4	MTHFD2	RALBP1	THS3	
ABD11	CMSS1	SPR137	LOC112267861	PDCD1L2	SLC26A6	ULBP1	BTG2	EPB112	KCTD6	MAK	RASD1	THOP1	
ABD117C	CNIH4	SPR137B	LOC112268155	PDE1B	SLC27A2	UMPS	BTG3	EPCL	KDEL2	MX2	RASD2	TIMM44	
ABHD4	CNTNAP1	SPR162	LOC112268260	PDE6G	SLC35C1	UNC119B	C14orf98	EPDR1	KDM1A	MYB	BASGBP2	TIMM50	
ABHD6	COA8	SPR171	LOC112268342	PDIA6	SLC35C2	UNC13D	C12orf29	EPHA2	KDM5D	MYBBP1A	BASP1	TIPIN	
ABHD8	COL19A1	SPR55	LOC112268412	PD2	SLC35G2	UNC45A	C12orf65	EPM2AIP1	KDM7A-DT	MYBL1	RFA	TIP2	
ABT82	COL4A3	SPR65	LOC112268437	PDGRL1	SLC39A1	UNC93BL	C15orf48	EP51	KIDRB33	MYC	RBL2	TIG2	
ACAC8	COX5A	SPR53P1	LOC1388780	PEA3	SLC39A11	JPK3822	C16orf72	EPICB2	NAAD556	MYO1G	NCB1B2	TIG3	
ACAD10	COXMM10B	SPR4	LOC1389641	PEAB1	SLC39A3	UNC93	C16orf82	EPICB8	NAA1108	MYO1B	RCC1	TIG8	
ACD1	COG2	SPR4M10A	LOC1389920	PEL0	SLC39A6	IRB1	C17orf80	EPICB9	NAA1523	MYO1B	RCC1	TIG8	
ACD3	CPAM2B	SPR10	LOC1383802	PELP1	SLC39A8	JRP1	C18orf25	EPJN1	NAA1841	NAASD	RGN	TMEP9	
ACRBP	CPNE7	SSAP	LOC728392	PFEN2	SLC3A2	USP10	CIORP	EMAR9	NAA2D13	NAAA	RDX	TMEM104	
ACSL1	CPY7	OSE1	LKH01	PFNA	SLC43A3	USP15	C10orf1	ERN1	KIF1C	NARP2	REG4	TMEM106A	
ACV81	CRACR2A	GSTK1	LGCAT1	PKFB3	SLG7A1	HRP2P2	C10orf98	ETNK2	KIF2	NAGS	RELB	TMEM109	
ACV82B	CRP2	GSTM3	LGCAT2	PKFK	SLG4A	HRP40	C10orf14	EXOC6B	REF10	NAMPT	REC2	TMEM111	
ACYP1	CROCC	GT2A2	JRBA	PGA3	SLC7A1	USP9V	C10orf20	EXOSC2	REF11	NAMPTP1	REK	TMEM126B	
ADAMTS15	CRIC1	GT2E2	JRCA4	PHACTR1	SLC9A7	UTP18	C7orf25	EXOSC3	REF12	NARS1	REXAP	TMEM144A	
ADDC2	CRLL1	GUSBP11	JRMP	PHACTR2	SLC5A1	UTP8	C6orf33	FAA1	REF13	NASP	BGSC	TMEM158	
ADDC3	CSL1	H2A1	JRP11	PHF13	SLFN13	UTP6	C9orf40	FAAH	RHUB	NAT10	BGMA	TMEM165	
ADD3	CSYF2	H2BC12	JRRC3	PHF23	SMARCD3	VDAC3	C9orf64	FADD	KRCL1	NAT8L	NSD	TMEM176A	
ADG8A	CTC1	H3-2B	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADG8B	CTSP4	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH1	CTNNA1	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH1A	CTNNA1	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH1B	CTNNA1	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH1C	CTNNA1	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH1D	CTNNA1	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH1E	CTNNA1	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH1F	CTNNA1	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH1G	CTNNA1	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH1H	CTNNA1	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH1I	CTNNA1	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH1J	CTNNA1	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH1K	CTNNA1	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH1L	CTNNA1	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH1M	CTNNA1	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH1N	CTNNA1	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH1O	CTNNA1	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH1P	CTNNA1	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH1Q	CTNNA1	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH1R	CTNNA1	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH1S	CTNNA1	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH1T	CTNNA1	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH1U	CTNNA1	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH1V	CTNNA1	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH1W	CTNNA1	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH1X	CTNNA1	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH1Y	CTNNA1	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH1Z	CTNNA1	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH2	CYPA3P	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH3	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH4	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH5	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH6	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH7	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH8	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH9	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH10	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH11	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH12	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH13	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH14	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH15	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH16	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH17	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH18	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH19	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH20	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH21	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH22	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH23	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH24	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH25	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH26	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH27	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH28	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH29	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH30	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH31	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH32	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH33	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH34	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH35	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH36	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH37	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH38	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH39	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH40	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH41	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH42	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH43	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH44	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH45	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM186	
ADH46	CYPA3	H3K9A	JRNC28	PHF5	SMC2C	YKDC1L1	CANX8	FAM122B	NET2E	NBEA2	NHEH3	TMEM1	

**ANEXO 12.** Lista de DEGs (828) exclusivos en NEG en la dinámica 0 vs 6 horas pi.

828 DEGs exclusivos en NEG en la dinámica 0 vs 6 horas pi (Foldchange ≥ 2)									
ABCD1	EMILIN2	LOC229737	RRBP1	CCNH	ICA1	OAS1	STOML1	YTHDF3	
ABHD14A	ENIG	LREN2	RRM1	CCR2	JFI44	OAS2	SUPT6H	ZBED3	
ABLIM1	ENHO	LRMDA	RRN3P1	CCR3	JF16	OAS3	SYNJ1	ZC3H12C	
ACADM	ENPP5	LRRC20	RRN3P2	CCR4	JFIT2	ORC5	SYNJ2	ZC3H12D	
ACHE	EPB41L3	LRRC32	RRP15	CCSAP	JFT81	OSBP13	SYTL3	ZC3HAV1	
ACOD1	EP58	LRRC45	RSAD2	CD109	IGHA2	OSCAR	TAPT1	ZDHHC11	
ACOT7	ERBB3	LRRC8C	RSRP1	CD300LF	IGLON5	OXCT1	TBC1D27P	ZDHHC14	
ACTR9	ER12	ISM6	RUBCNL	CD5	IGLV7-43	OXLD1	TBL1XR1	ZEB2	
ACTR1B	ERRF11	LTBP4	RWDD2B	CD70	IGSF9B	PAD1A	TBRG1	ZFPM1	
ACY1	ESAM	LTF	S100A12	CD74	IL13RA1	PAK1	TCEAL4	ZHX2	
ADAM19	ETS2	LTK	S100A10	CD9	IL18	PALD1	TCE3	ZNF101	
ADGRE2	EXT1	LTV1	S100A2	CD45	IL1A	PAOX	TCF7	ZNF133	
ADM	F2R1L	LUCAT1	SAMD10	CDKN2AIPN1	IL1B	PAP52	TCTEX1D2	ZNF135	
ADM5	E3	LYL1	SAMD9L	CEACAM21	IL1RAP	BARP9	THAP2	ZNF154	
AFAP1	FAAH2	MACO1	SDC3	CEACAM6	IL23A	BARBPB	THNS11	ZNF22	
AGAP9	FADS3	MAD1L1	SDK2	CEACAM8	IL36RN	PDE6D	TIGIT	ZNF250	
AGFG2	FAHD2B	MAGFE1	SEC14L1	CEBPA	INPP5A	PDE7A	TIMP1	ZNF266	
AGMAT	FAM102B	MAL	SEC16A	CEP78	INPP5K	PDE8B	TINAGL1	ZNF32	
AGO2	FAM216A	MAML1	SEC22B4P	CERS4	INSM1	PDGFA	TLE1	ZNF335	
AHDC1	FAM222A	MAMLD1	SEC24D	CERS6	IQGAP3	PDLIM1	TLE3	ZNF444	
AIF1	FAM49A	MAN2A2	SEMA4D	CELS1	IRF6	PDLIM7	TLE4	ZNF503-AS2	
AKR1A1	FASN	MAP3A	SERN3	CHD2	IRS2	PRD8	TLR2	ZNF54	
AKR1C1	FBRSL1	MAP15	SERPINB2	CHN2	IRS1	PERP	TLR6	ZNF605	
ALDOE	FBXL19	MAP3K10	SERPINB4	CHP1	ITGA6	PEX11A	TMEM127	ZNF697	
ALGR	FBXO10	MAP4	SERPINBR	CHRM3-AS2	ITGB5	PGAP1	TMEM158	ZNF702P	
ALPK1	FBXO11	MAP9	SERPINB9	CHST15	ITPKB	PGP	TMEM160	ZNF837	
ALPK2	FBXO6	MAPK11	SERTAD1	CLDN5	JTFRID2	PHE1	TMEM163	ZSWIM9	
ANK3-DT	FBXW7	MARCKSL1	SESTD1	CLEC4A	JAKMIP1	PHE1	TMEM181	YLPM1	
ANKRD36	FCGR2B	MB21D2	SF3A1	CLEC5A	JAKMIP2	PHE20	TMEM184B		
ANKRD36B	FCRL3	MBLAC2	SFXN3	CLEC6A	JARID7	PHLDB1	TMEM187		
ANKRD50	FCRLB	MCCC1	SGCD	CLECL1	JDP2	PHYH	TMEM192		
ANKS6	FDXR	ME3	SGSM1	CLMN	JMJD6	PIGN	TMEM218		
ANP32A	FEZ1	MEAK7	SH2B2	CLN51A	JOSD2	PIGO	TMEM273		
ANTXR2	FGFR1	MECR	SH3BGR12	CLSTN3	KANK1	PIGT	TMEM35B		
APBB3	FLNB	MED16	SHB	CLU	KCTD17	PIGY	TMEM41B		
APLP2	FNBP4	MEX3B	SHF	CMIP2	KCTD9	PIK3C2B	TMEM51		
APOBEC3C	FNDC3A	MFSD3	SIT2	CMTM5	KIAA0753	PIM3	TMEM86A		
APOBEC3D	FNIP2	MGL1	SIGLEC14	CNN2	KIAA1324	PIN4	TMEM9		
APOBEC3H	EQP4	MICALL2	SIK2	CNNM4	KIAA1324L	PLA2G4A	TMIGD2		
ARAP1	ERMAD4B	MICOS13	SIK3	CNOT2	KIF21A	PLAT	TMTCA		
ARAP3	FZD1	MIR3142HG	SIPA1L1	COL6A1	KIF21B	PLXND1	TNFRSF11A		
ARHGAP18	GABARAPL1	MMP17	SIT1	COL6A2	KIFC3	PMM2	TNFRSF13B		
ARHGDI8	GADD45A	MMP7	SLA2	COPA	KIR2DS1	PNP	TNFRSF1A		
ARHGFE28	GALNT11	MPP1	SLAMF6	COQ2	KLF5	PODXL	TNFSF15		
ARHGFE7	GALNT3	MRA5	SLC12A2	COQ4	KLHL17	POLD1	TNNT1		
ARL6IP5	GBF1	MRPL24	SLC12A7	CPD	KNDC1	POMGNT1	TNS3		
ARMC9	GCKR	MS4A4E	SLC12A7	CR2	KRT17	POR	TOB1		
ARRB2	GDPD5	MSRB1	SLC16A3	CRIP1	KRT5	PPBP	TOGARAM2		
ARRDC3	GF1B	MT2A	SLC1A4	CRNDE	KRT81	PPCDC	TOP2A		
ARV1	GFPT2	MTG1	SLC1A7	CRTAM	KRT86	PPFIBP2	TOR4A		
ATG4C	GIMAP2	MTMR11	SLC22A15	CRVBG1	LACC1	PPP1CB	TOX2		
ATG9A	GIPC1	MTS52	SLC22A18	CSGALNACT	LACTB2	PPP1R13B	TPO5L		
ATP1A3	GLRX	MTX2	SLC22A23	ESTA	LDHA	PPP1R16A	TPM4		
ATP1B3	GNA11	MUCL1	SLC25A37	CTH	LDB1	PPP1R35	TPPP3		
ATP6V0E2	GNA12	MVB12A	SLC25A42	CTNNB1	LEF1	PPP5C	TRADD		
ATP8B4	GNB5	MYBL2	SLC25A43	CTSB	LETM2	PRIMPOL	TRIB3		
ATP9A	GNG14	MYBPC3	SLC2A5	CTSB	LGMN	PRKAR2A	TRIM24		
BGAT3	GP1BB	MYEF2	SLC35E4	CTSW	LGR6	PRNP	TRIM38		
B3GLCT	GP9	MYH9	SLC38A3	CITNBP2NL	LIN7B	PRRT4	TRIM62		
BACH2	GPATCH2L	MYO10	SLC43A2	CXCL2	LINC-PINT	PSD	TRMT5		
BAX	GPD2	MYO5A	SLC5A6	CXCL3	LINC00158	PSME4	TRPS1		
BCAR3	GPR141	MYOF	SLC9A1	CXCL8	LINC00656	PTCRA	TRPV3		
BCOR	GPR155	NABP1	SLC9A7P1	CYB5E1	LINC00665	PTDS52	TSACC		
BET1P1	GPR160	NAGLU	SLC04C1	CYP4E3	LINC01094	PTGR2	TSC22D1		
BEX1	GPSM2	NAT14	SLEN11	CYSLTR1	LINC01215	PTGS2	TSEN15		
BFP1	GRAMD1B	NRP1	SLEP1	DAM1	LINC01283	PTPN7	TSEN54		
BMPR1A	GRHL1	NBPF14	SMAD6	DARS1	LINC01504	PTPRN	TSPAN17		
BORCS5	GRM2	NBFE26	SMC4	DCXR	LINC01786	PWWP3A	TSPAN2		
BRAF	GTE2IP13	NCEH1	SMIM30	DDR2	LINC01963	PXK	TSPYL2		
BRD1	GTF3A	NCOR2	SMOX	DDR2	LINC02595	PXMP2	TTC3		
BRD2	H2BC17	NCR3LG1	SMUG1	DDX12P	LIX1-AS1	OSOX1	TTC9		
BRD4	H3-2	NDST1	SNCA	DDX58	LOC1001333	RAB3D	TIT15		
BRPF3	HAPLN3	NDUF7	SNHG15	DDX60	LOC1004191	RAB43P1	TUBAA4A		
BRD11	HBA1	NECTIN1	SOC3	DENND5A	LOC1005060	RALGAP1	TUFT1		
CL2orf42	HBA2	NEIL1	SOC56	DHCR7	LOC1005063	RAPH1	TUT7		
CL2orf60	HBB	NFAT5	SOS2	DIAPH2	LOC1009967	RASAL1	TXK		
CGAR2	HCG18	NFATC1	SOX4	DIRAS1	LOC1019298	RASSE7	UAP1		
CACNA1G	HDAC11	NIBAN2	SOX8	DIXDC1	LOC1026064	RFOX2	UBE2D		
CACNA2D2	HDDC2	NIPAL3	SPAG16	DMACL1	LOC1027235	RBM43	UBE2O		
CAMP	HEL2	NIPSNAP1	SPAG4	DNAJA4	LOC1027236	RBM5	UBA2		
CAMTA1-DT	HCSNAT	NKD1	SPAG9	DNAIC19	LOC1027237	RBPS	UBA4		
CAPN2	HHEX	NLR4	SPATA9	DNAL1	LOC1053694	REEP4	UGCG		
CAPRN2	HHIPL2	NME3	SPINK1	DNAL4	LOC1053730	RELL1	ULBP2		
CARD6	HID1	NOCT	SPP1	DNMBP	LOC1053736	REESD	ULK1		
CARS1	HIP1R	NOTCH2	SPRED2	DOK2	LOC1053750	REX2	UPK3A		
CASP17P	HK2	NOTCH2NLB	SPRYD7	DOP1A	LOC1053757	RHBDD2	UOCC2		
CAVIN1	HILA-A	NOTCH3	SPTBN1	DPM3	LOC1053759	RHBDF2	UOCR11		
CCDC102A	HILA-DR	NPC2	SPTBN4	DPYSL4	LOC1053767	RHOBTB1	VIPR2		
CCDC167	HILA-DRB1	NPHP4	SRC	DTHD1	LOC1053772	RIOK3	VMO1		
CCDC34	HILA-F	NPIP4	SRCAP	DUSP23	LOC1053772	RN75L2	VRK2		
CCDC58	HMGCL	NPTX1	SS18L1	ECE1	LOC1053777	RNASEH1L-AS1	VSIG1		
CCDC85B	HNRNPUL1	NRCAM	SSH1	ECHS1	LOC1053789	RNF122	VWCE		
CCDC93	HOMER1	NSL1	SSTR3	EDEM3	LOC1079842	RNF149	WARF1		
CCL1	HOMER2	NSME	ST14	EDN1	LOC1079842	RNF168	WASHC3		
CCL19	HPF1	NUDT4	STG6ALNAC	EEF1AKMT1	LOC1079844	ROB3	WDR62		
CCL2	HRH4	NUDT16	STR5A1	EGR1	LOC1079866	RPH3A	WDR92		
CCL20	HSC8	NUMA1	STARD4	EGR2	LOC1079871	RPL9P29	WDYHV1		
CCL24	HSD17B6	NUMBL	STK24	EHD4	LOC1122682	RPL1P1	WNT10A		
CCL4L1	HSPA2	NUP98	STK40	ELF4	LOC284191	RPS26P25	WNT11		
CND2	HSPB11	NXF1	STN1	EMD	LOC653303	RPSAP58	WSB1		

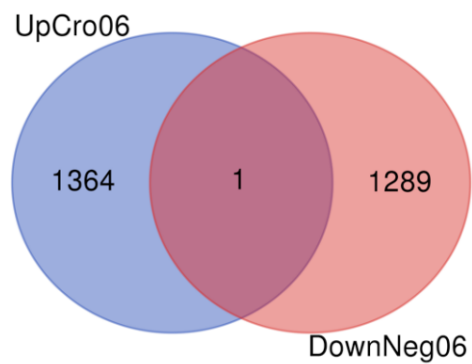
## ANEXO 13. Lista de DEGs (1329) compartidos en NEG y CRO en la dinámica 0 vs 6 horas pi

1329 DEGs compartidos en CRO y NEG en la dinámica 0 vs 6 horas pi																
AATK	CHD1	GART	LONRF3	PACSN1	S100A6	TNFRSF18	BEGAIN	DUSP1	IFRD2	MSC	PRKAR2B	SNAI1	ZDHHC16			
ABALON	CHMP1B	GAS2L1	LPL	PADI2	S100A8	TNFRSF9	BEST1	DUSP3	IGFBP3	MSH2	PRKCA	SNRK	ZDHHC9			
ABCA1	CHRNA9	GAS7	LRATD2	PAICS	S100A9	TNFRSF10	BICD1	DUSP6	IKBIP	MSMO1	PRKCB	SNRPD1	ZFP38			
ABCA2	CHST7	GASK1B	LRFN3	PAK3	S1PR3	TNFRSF13B	BLK	DYNCH1H	IL10	MSR1	PRKCE	SNX29	ZFP36L2			
ABCC3	CHST1	GATD1	LRFN4	PACR4	FAM90D	TNFRSF8	BLVRB	DUSP	IL13RA	MTAP	PRMT1	SNR38	ZNF21			
ABCE1	CDC6	GCHI	LRG1	PAQB8	SAT1	TNIP3	BMPT8A	DZANK1	IL19	MTLN	PRMT5	SORD	ZMYND19			
ABCG1	CDC	GCNT4	LRP1	PARD6G	SBF2	TNRC18	BOLA1	EBI3	IL1R1	MTMR6	PRMT5	SORT1	ZNF10			
ABL1	GSH	GCSH	LRP2	PARP15	SCSD	TNS1	BOPI	EBNA1BP2	IL1R2	MXD1	PRMT9	SORT1	ZNF143			
ABLIM3	CKAP4	GFLI	LRP3	PARS2	SCARB1	TOMM40	BRX1	EBP1	IL1RL2	MXR48	PRR16	SOW4HC	ZNF185			
ACCS	ELEC10A	GFOD2	LRP8	PARVG	SCART1	TOMM5	BST1	ECHDC2	IL1RN	MYADM	PRSS23	SPAGE	ZNF239			
ACTL6A	GLEC7A	GGCT	LRRC25	PATL2	SCD	TPS3INP2	BTAFL	ECHDC3	IL2RA	MVC	PRXL2A	ZNF276				
ADA	CLK1	GGTA1P	LRRC42	PCBP3	SCIMP	TPCN2	BTG1	EEF1AKNMT	IL6	MYO88	PSAP	SPATA20	ZNF331			
ADA2	CLNE	GIMAP4	LRRC8D	PCNT	SCIN	TPH1	BTIA	EEF2KMT	INHBA	MYU1	PSAT1	SP1	ZNF367			
ADAM28	CLNR	GIMAP5	LRRC8	PCSK5	SCOK	TPM2	BTNL4	EEFNB2	INCA2	MYH4	PSMA2	SPD1L	ZNF467			
ADGRE3	CLPP	GIMAP6	LRRC9	PCSK6	SCPEP1	TRAF1	BYSL	EMF	ISOC1	MYO15B	PSMA6	SPOCK2	ZNF469			
ADGRE4P	CLYBL	GIMAP7	LST1	PDCD2L	SDC2	TRAF2	BZW2	ELF1	ISOC2	MYO1B	PSMB8	SPOD2	ZNF485			
ADGRE5	CMIP	GIMAP8	LT4H	PDCD4-AS1	SDC4	TRAPP9	C11orf21	ELL2	IRF2	MYO1E	PSMG1	SPRED1	ZNF57			
ADHF1	CMTM8	GJB2	LY6K	PDCD5	SDF2L1	TREM1	C11orf95	ELOVL7	IRF2BP2	MYO1F	PSMG4	SPTN1	ZNF593			
ADD	CNOT6L	GIB6	LY86	PDE2A	SDHAF1	TRH	C15orf39	EMILIN1	IRS2	MYO9B	PTGER2	SOLE	ZNF674-AS1			
ADORA2A	COA3	GK5	LYN	PDE4A	SDHAF3	TRIM16	C17orf58	EMPI1	ISOC2	MYR	PTGES	SRA1	ZNF696			
ADORA2B	COA4	GLO1	LYPD2	PDE4B	SEC14L2	TRIM47	C19orf38	ENKDF1	ITGA2B	NAA20	PTGR1	SFBFP1	ZNF703			
ADRB2	COA6	GILR3	LYPD3	PDE4D	SEC31B	TRIM58	C19orf48	ENO1	ITGA5	NANP	PTGS1	SRGN	ZNF710			
ADIRP	COA7	GILR5	LYSM2D	PDE4DIP	SECTM1	TRIM65	CLQA	ENOPH1	ITGAM	NAPL4	PTPAA1	SRI	ZNF731P			
AEN	COL1A1	SLIT1D1	LYZ	PDSF5	SEH1	TRIP10	EIF4E10B	EPAS9	ITGA4	NANK	PTPBL1	SRI	ZNF749			
AFF3	COL2A3	GULU	MACE1	PDGFRA	SELENOK	TRMT61A	C1orf122	EPAS1	ITGB2	NCALD	PTPRM	SRP1	ZNF771			
AFF4	COL3	GNA13	MAD2L2	PDIA5	SEMA3C	TSC22D2	C1orf216	EPHA4	ITGB3	NCAM1	PTRH1	SRPR	ZNF775			
AGAP1	COPB5	GNA15	MADD	PDPI1	SEMA4A	TSC22D3	C3	EPDR	ITGB8	NCN	PTRH2	SRRM2	ZNF784			
AHCY	COTL1	GNGL0	MAFB	PDSS1	SEMA4C	TSPAN13	CBAR1	FRCC5	ITIH4	NC1	PTX3	SRXN1	ZNR1			
AHNAK	CPEB2	GNG7	MALTI1	PDXP	SEMA6B	TSPAN32	C4orf33	ERGLIC1	ITPR1	NC1C	PUM3	SSB	ZNR3			
AIFM2	CPEB4	GNG8	MAML3	PDOZ4	SEPTIN10	TSPAN4	C4orf46	ERMN	INVS1ABP	NC2	PUS7	SSH2	ZSWM6			
AK4	CPED1	GNL3	MAP3K2	RECAM1	SERINC5	TSPO	CSAR1	ESF1	JADE3	NCKAP5L	PVR	STAB1	ZZF1			
AK5	CPD	GNPDA1	MAP3K21	PEL2	SERPINA1	TSB3	C5orf30	ESPL1	JAG1	NC51	PVT1	STAMBP1L1				
AKAP12	CPVL	GNPNAT1	MAP3K8	PEL1	SERPINE1	TTCC	C6orf223	ESY17	JMID1C	NC5TN	PKDC1	STAROR				
AKNA	EEL	GOLGA8B	MAP703	PER1	SERPINF1	TTLL12	C6orf22	ETV8	JMID4	NCCL	PPM1	STEP3				
AKM1	ERBBP8	GPAT2	MAPK7	PER2	SERPINM1	TTTH3	CABR15L	EXOC4	IMV	NDL1	PW1	STK2				
ALDH1A1	ERF1	GPAT3	MARCD	PEL3	SESN3	TTTH3	CBP4	EXOSC4	IOSD1	NDP	PYCR1	STK38L				
ALDH1A2	CREM	GPATCH4	MARVELD1	PF4	SET	TUBA1B	CACNA1L	EXOSC5	UPT2	NDRG1	PYGL	STOM				
ALDH1B1	CRISP1	GPBAR1	MRO3	PKFBP2	SETD1B	TUBA1C	CAD	EZH2	JUND	NDUFAF2	OPCT	STOML2				
ALDH2	CRISPLD2	GPCPD1	MROAT1	PGAMS	SFXN4	TWNK	GDM1	EZR	JUP	NDUFAF4	RAB13	STRIP2				
ALDH3B1	CRIS1	GPR132	MCAT	RGD	SGK1	TXN	GARM1	F13A1	KALRN	NDUFAF8	RAB40C	STX1A				
ALG3	CRTPA	GPR180	MCEMP1	PGGHG	SGMS2	TXNRD1	CARN51	FABP5	KCNAB2	NEAT1	RAB44	SUCNR1				
ALKBH2	CSF1	GPR35	MCM2	PHB	SGPP2	TYROBP	CASP9	FAIM	KCNK3	NEEDL4	RAB78	SULF2				
ALKB3	CSF1R	GP12	MCM3	PHLDA1	SH2B3	TYNDL1	CASS1	FAM111B	KCNJ15	NEED9	RABEPK	SULT1A1				
ALX2L	CSF2	GPX1	MCM4	PHLDB3	SH2B3A	UBR3D	CASTOR1	FAM153A	KCNMB1	NEF	RALGAP2	SUR4				
AMER1	CSF3	GPX2	MCRIP2	PKR3	SH3BP4	UBL4A	CAVIN2	FAM157B	KCNQ1	NETO1	RAN	SUDI1				
AMPD2	CSF3R	GRAMD4	MDPC	PK3R2	SH3BP5	UBTDO	CEFA2T3	FAM171A1	KOM4B	NETO2	RANBP1	SVAP1				
AMY2B	CSRNP1	GRASP	MED14	PIM2	SH3TCL	UNG	CBR1	FAM174C	KOM6B	NEURL1	RANBP2	SYNE3				
AMZP1	CS13	GRN	MEF2C	PITPNM2	SH5A3	URB2	CBR3	FAM177A1	KOSR	NFAM1	BANGFR	SYNM				
ANKK1	CS1B	GRPEL1	MEF2D	PKYD	SIGIRR	USP11	CBX3	FAM207A	KEAP1	NFE2L3	RAP1GAP2	SVTL				
ANKRD13B	CTZ5	GSDME	MEFV	PKIB	SIGLEC10	USP18	CCDC124	FAM214B	KHK	NHP2	RAP2B	TACCL1				
ANQ9	CTB-4116.1	GSR	MET	RKP4	SIGLEC9	USP31	CCDC159	FAM434	NIAA0895L	NICN1	BABA	TAFA8				
APIA8	CTSL	GSTM2	METRN1	PLAUR	SIGMAR1	USP36	CCDC18-AS1	FAM89A	KIFC2	NID1	RASGEF1B	TALAM1				
API51	CTSS	SPTF1	METTL1	PLB1	SIB1B	USP3K	CCDC57	FAMC02	RIT	NIFK	RASSF2	TALDO1				
APOLFC3A	CTU1	H1-9	METTL2B	PLCB2	SID1	UTP14A	CCDC7	FANCA	KLF2	NLE1	RASSF4	TBC1D5				
APDB8	CUK1	H2AC6	MEK3D	PLCG2	SIRPB1	UTRN	CCDC36	FARSA	KLF3	NLRP1	RBS5	TBMS1				
APDE	CKX1	H2BC21	MEHA51	PLD1	SIRPB2	UVSSA	CC122	FARSB	KLF4	NLRP12	RBM38	TCL2				
APOLL1	CKX16	HAL	MFSO2A	PLD4	SIRT2	VASH1	CCND1	FBLN2	KLF8	NLRP3	RBP7	TOP1L2				
AQP3	CKX5	HAS1	MGST1	PLDE	SKL	VAT1	CCNT1	FBP1	KLHL3	NMR	RCAN1	TENT4B				
AREG	CKX6	HAS2	MICAL2	PLEC	SKL	VCAN	CCR1	FBLX15	KLR2C	NMEL	RCAN2	TENT5C				
ARHGAP26	CKCR2P1	HAVCR2	MIDN	RLEKHA2	SLAMF1	VDR	CCR6	FBOX04	KNOP1	NME2	RCN1	TES				
ARHGAP4	CKCR4	HBEFG	MIR1	RLEKHG2	SLAMF7	VEGFA	CC12	FBOX9	LAMB3	NOB1	RCOR1	TESC				
ARID3B	CVB5A	HDC4C	MIR155HG	RLEKHM1P1	SIL1C1A1	VEGFB	CC13	FCEB1	LAMP1	NOO2	REC8	TEF2				
ARL2	CVB8	HDFG13	MIR3945HG	RLEKHO2	SIL1C1A2	VEN1D	CC16A	FCGR1A	LAPTM4B	NOG	RELT	TEK1D				
ARMC1	CVS11R2	HDFH3	MIR4607HG	RLEKHT	SIL1C1A3	VIPER1	CC14	FCGR1B	LARBA	NOL4L	REK1	TEK2				
ARMC4	DAD1	HERP1	MIF1	PLNB	SIL2C1A17	VPS13B	CD190	FCGR1C	LAR51	NOLC1	RG1	TFB2M				
ARNT12	DCAF13	HECA	MKKS	PLK2	SIL2C4A4	VPS37B	CD1D	FCGR1	LATS2	NONOP2	RG51	TFPI2				
ASAH1	DCTPP1	HECTD1	MKNK2	PLK3	SIL2SA1	VSIR	CD2	FCN1	LENG8	NOP16	RG512	TGFBI				
ASB13	DCUN1D5	HERC5	MLC1	PLPFR2	SIL2SA10	WAS	CD200	FCRL1	LFNG	NOTCH1	RG513	TGFBI				
ASGR1	DDIT4	HE54	MMP1	PLSCR1	SIL2SA17	WDFY2	CD248	FCRL2	LGALS12	NPDC1	RG518	TGFBR3				
ASGR2	DDX3Y	HEXIM1	MMP14	PLXDC1	SIL2SA45	WDFY4	CD274	FCRL6	LGALS2	NP1B11	RG52	THBD				
ASTL	DEK	HILPD4	MN1	PLXDC2	SIL27A4	WDR12	CD300C	FDX2	LGAL59	NP1B6	RHBD03	THEM6				
ATAD2A	RENND1A	HK3	MNDA	PLVNA1	SIL29A1	WDR3	CD300B	FERMT2	LILRB4	NPW3	RHOQ	THEM52				
ATG2A	RENND3	HIA-8	MCB3A	PLNMB2	SIL29A14	WDR4	CD300L8	EGO2	LMNA1	NPQ1	RHOBTB3	TIFA				
ATC	RGK0	HIA-DRB3	MFGS1	PM20D2	SIL29A2	WDR43	CD390	FGO4	LMNS1	NR1D2	RIC3	TIMM110				
ATL3	DCHR24	HIA-E	MPLKIP	PM2PA1	SIL29A9	WDR47	CD33	FGFB1	LINC00926	NR2C2AP	RILP2	TIMM13				
ATP2A3	DHODH	HLX	MPO	PMNMA3	SIL35D1	WDR76	CD36	FG12	LINC01001	NR2F6	RIN1	TIMM23				
ATP2B1	DHS3	HMB5	MPZL1	PNQ1	SIL37A2	WDR77	CD37	FGR	LINC01679	NR4A1	RIN3	TIMMSA				
ATXN7	DHS9	HMOX1	MRC1	PNPLA1	SIL38A5	WDR89	CD4	FKBP4	IPN	NR4A2	RIOX2	TIMP2				
AUTS2	DHX33	HOMER2	MREG	PNPLA7	SIL39A14	WEE1	CD55	FLJ46875	LITAF	NR4A3	RNAS6E	TIPARP				
AVP1	DIAPH1	HPLD	MRM2	RNP1	SIL41A2	WLS	CD59	FLVCR2	LLGL2	NRARP	RNAS6T2	TKTL1				
AXL	DIMT1	HPRT1	MRLP12	POLO2	SIL43A1	WNT5A	CD79A	FAM111	LMAN2L	NRGN	RNF125	TLC03A				
B3GALT6	DIP2A	HPSE	MRLP14	POLE2	SIL49A4	WNT7A	CD86	EGLR2	LMNA	NRIP1	RNF130	TLL1				
B3GNT5	DKC1	HSPA7	MRLP15	POLR2H	SIL50A1	WRNIP1	CD93	EGS	LMNB2	NRIP2	RNF152	TLL4				
B3GNT7	DMT1B	HRP23	MRLP17	POLR2J	SIL50A4	XYLB	CDM	EGS2B	LARBA	NRIP2	RPRR-AS1	TLM16				
BAGALT1	DNAH1	HTATSF1P2	MHR3	POLB3K	SIL66A	XYT2	CDCA7	EGS12	LCO103984	NSDH	BEF2	TMC63				
BAGALT2	DNAH5	HYAL2	MRLP32	POLB3K	SIL7A11	YDIC	CDK4	FPR1	LCO103928	NUCCD1	RPIA	TMED3				
BAGAT1	DNPH1	IBAS7	MRLP4	POP2	SIL7A5	YES1	CDK17	FR2	LCO1027239	NP42	RPL21P16	TMEM101				
BALAC	DOCK2	ICMT	MRLP52	PPA1	SIL7A7	VIEFA	CDK4	FRMPD3	LCO1027248	QAF	RPL22L1	TMEM106C				
BAIAP2	DOHH	ICOS1G	MRLP517	PPAT	SIL8A1	YPEL4	CDK5RAP3	FRY	LCO1053693	GBSCN	RP225	TMEM144				
BANK1	DOK3	IDO1	MRLP523	PFIFBP1	SIL9A9	YPEL5	CD51	FSCN1	LCO1053711	GCAD2	RPTOR	TMEM147				
BATF	DOX	IDUA	MRLP526	PIPF	SIL9P	YRDC	CDT1	FSD1L	LCO1053716	ODF3B	RRAD	TMEM170B				
BATF3	DOP1B	IBSL	MRLP528	PPM1L	SILX	YTHDC1	CEBPD	FYX08	LCO1053733	OSDH	RRAGD	TMEM175				
BAT2B	DRAGT1	IB30	MRLP531	PPP141B	SMAD7	ZBTB16	ELF12	GAB	LCO1053743	BLG1	RBM2	TMEM176B				
BAS1	DNAH2	IT1L	MRLT04	PRAM1	SMAR2	ZBTB21	ELF6	GAB2	LCO1053748	OR1	RBM2B	TMEM176B				
BCAT2	DYPD	IT13	MS4A14	PRC1	SMCHD1	ZBTB42	CEMP2	GABR1	LCO1079848	OSBP10	RBP1	TMEM21				
BC12L1	DYSL13	IT15	MS4A6A	PRDX1	SMIM25	ZBTB43	CENPC	GADD45G	LCO1079872	OSGIN1	RBP2	TMEM28				
BC9L	DTD2	JENGR1	MS47	PRDX4	SMKR1	ZCCHC24	CENPX	GADD45GIP1	LCO1122680	OSR1	R5S1	TMSB4Y				
BCR	DTYMK	JFRD1	MSANTD3	PRIM1	SMYD5	ZDHHC11B	CE54A	GALC	LCO154761	P2RX1	RTN4	TMK1				
BEGAIN	DUSP1	IFRD2	MSC	PRKAR2B	SNAI1	ZDHHC16	CTN3	GALE	LCO155060	P2RX4	RUSC2	TNFAIP2				
BEST1	DUSP3	IGFBP3	MSH2	PRKCA	SNRK	ZDHHC9	CFP	GALK1	LCO200772	PAZG4	BUB1B2	TNFAIP6				
BICD1	DUSP6	IKBIP	MSMO1	PRKCB	SNRPD1	ZFP36	CHCHD1	GAPT	LCO653513	PABPC1L	RYR4	TNFRSF12A				
BLK	DYNCH1H	IL10	MSR1	PRKCE	SNX29	ZFP36L2	CHCHD4	GARS-DT	LCO729218	PACCL1	S100A4	TNFRSF13E				

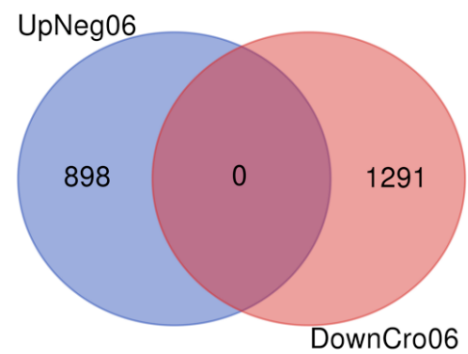
**ANEXO 14.** Comparación en búsqueda de DEGs antagónicos en la dinámica 0 vs 6 hpi.

**Genes Antagónicos en las 0 vs 6 hpi en la interacción T.gondii PBMCs humanos**

UP CRO (1365) 06 vs DOWN (1289) NEG 06



UP NEG (898) 06 vs DOWN CRO (1289) 06



**ANEXO 15.** Artículo publicado (2) en la revista *Experimental Parasitology*.

*Experimental Parasitology* 219 (2020) 108020



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

**Experimental Parasitology**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yexpr](http://www.elsevier.com/locate/yexpr)



Human peripheral blood mononuclear cells as an *ex vivo* model to study the host parasite interaction in *Toxoplasma gondii*

Alejandro Acosta-Dávila, Alejandra Acosta-Espinel, Alejandro Hernández-de-Los-Ríos, Jorge Enrique Gómez-Marín

*Grupo GEPAMOL, Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Ciencias de La Salud, Universidad Del Quindío, Colombia*



ANEXO 16. A. DEGs " hipotéticas en *T. gondii*

222 DEGs DOWN hipoteticos de <i>T.gondii</i> en PBMCs-h NEG 0 h vs 1h					
TGGT1_220650	TGGT1_227820	TGGT1_286190	TGGT1_204150	TGGT1_306400	TGGT1_237880
TGGT1_410790	TGGT1_227300	TGGT1_286140	TGGT1_203480	TGGT1_279320	TGGT1_264950
TGGT1_287430	TGGT1_226660	TGGT1_284645	TGGT1_202070	TGGT1_267650	TGGT1_287970
TGGT1_296231	TGGT1_226620	TGGT1_213920	TGGT1_201240	TGGT1_265770	TGGT1_289120
TGGT1_411500	TGGT1_224980	TGGT1_287235	TGGT1_262950	TGGT1_264890	TGGT1_291075
TGGT1_358120	TGGT1_224570	TGGT1_286910	TGGT1_261960	TGGT1_288265	TGGT1_210345
TGGT1_221840	TGGT1_224320	TGGT1_286670	TGGT1_261610	TGGT1_289150	TGGT1_305510
TGGT1_222270	TGGT1_224070	TGGT1_286270	TGGT1_257610	TGGT1_205500	TGGT1_306020
TGGT1_297120	TGGT1_365100	TGGT1_286230	TGGT1_256800	TGGT1_202730	TGGT1_313940
TGGT1_220930	TGGT1_234640	TGGT1_285780	TGGT1_256780	TGGT1_282150	TGGT1_314265
TGGT1_221690	TGGT1_235720	TGGT1_285650	TGGT1_264210	TGGT1_206460	TGGT1_216770
TGGT1_221818	TGGT1_236850	TGGT1_238410	TGGT1_262933	TGGT1_311070	TGGT1_216420
TGGT1_222300	TGGT1_275430	TGGT1_239050	TGGT1_258970	TGGT1_312175	TGGT1_216240
TGGT1_222330	TGGT1_227875	TGGT1_239340	TGGT1_257550	TGGT1_313495	TGGT1_215950
TGGT1_222440	TGGT1_227320	TGGT1_240365	TGGT1_257330	TGGT1_307860	TGGT1_309610
TGGT1_297690	TGGT1_226670	TGGT1_240380	TGGT1_227980	TGGT1_219460	TGGT1_311030
TGGT1_297745	TGGT1_226350	TGGT1_242080	TGGT1_227880	TGGT1_245580	TGGT1_274160
TGGT1_297790	TGGT1_225270	TGGT1_244130	TGGT1_290310	TGGT1_247370	TGGT1_274000
TGGT1_297830	TGGT1_225000	TGGT1_244240	TGGT1_290620	TGGT1_268260	TGGT1_273065
TGGT1_298010	TGGT1_224540B	TGGT1_244260	TGGT1_291005	TGGT1_268240	TGGT1_270720
TGGT1_254530	TGGT1_235420	TGGT1_238895	TGGT1_305470	TGGT1_360740	TGGT1_269210
TGGT1_254910	TGGT1_235940	TGGT1_239410	TGGT1_293270	TGGT1_200410	TGGT1_269075
TGGT1_254960	TGGT1_236790	TGGT1_242030	TGGT1_293330	TGGT1_230000	TGGT1_268330
TGGT1_299250	TGGT1_237070	TGGT1_242260	TGGT1_293170	TGGT1_230110	TGGT1_250700
TGGT1_299130	TGGT1_237240	TGGT1_242860	TGGT1_294730	TGGT1_230860	TGGT1_251560
TGGT1_320440A	TGGT1_237290	TGGT1_244300	TGGT1_296015	TGGT1_230870	TGGT1_251857
TGGT1_320440B	TGGT1_214510	TGGT1_229030	TGGT1_207750	TGGT1_231790	TGGT1_218500
TGGT1_320080	TGGT1_214610	TGGT1_229200	TGGT1_207880	TGGT1_274180	TGGT1_218240
TGGT1_319590	TGGT1_214750	TGGT1_229770	TGGT1_321610	TGGT1_273850	TGGT1_217610
TGGT1_319580	TGGT1_214990	TGGT1_230900	TGGT1_212780	TGGT1_272155	TGGT1_247040
TGGT1_318390	TGGT1_215550	TGGT1_230940	TGGT1_213700	TGGT1_271370	TGGT1_268780
TGGT1_318380	TGGT1_309720	TGGT1_231360	TGGT1_213790	TGGT1_270150	TGGT1_268610
TGGT1_318760	TGGT1_310560	TGGT1_232560	TGGT1_287240	TGGT1_248900	TGGT1_205562
TGGT1_318360	TGGT1_311280	TGGT1_232970	TGGT1_286540	TGGT1_251460	TGGT1_205050
TGGT1_318290	TGGT1_312590	TGGT1_233370	TGGT1_247450	TGGT1_278580	TGGT1_270090
TGGT1_211220	TGGT1_312700	TGGT1_233430	TGGT1_248720	TGGT1_278130	TGGT1_248170
TGGT1_211000	TGGT1_313430	TGGT1_233735	TGGT1_249520	TGGT1_277940	TGGT1_229260

<b>Continuacion anexo 16. B: 163 hipoteticas NEG RH01 UP</b>			
TGGT1_256650	TGGT1_294990	TGGT1_205740	TGGT1_313055
TGGT1_409250	TGGT1_295100	TGGT1_204010	TGGT1_219742
TGGT1_322110	TGGT1_293252	TGGT1_204000	TGGT1_219170
TGGT1_241710	TGGT1_295440	TGGT1_202445	TGGT1_218340
TGGT1_212725	TGGT1_208830	TGGT1_202050	TGGT1_217400
TGGT1_301480A	TGGT1_209020	TGGT1_201180B	TGGT1_245520
TGGT1_323310	TGGT1_209045	TGGT1_201180A	TGGT1_245980
TGGT1_411080	TGGT1_210095	TGGT1_260800	TGGT1_249040
TGGT1_411170	TGGT1_220585	TGGT1_260400	TGGT1_277230
TGGT1_212420	TGGT1_213880	TGGT1_259600	TGGT1_218350
TGGT1_411390	TGGT1_286000	TGGT1_256700	TGGT1_217410
TGGT1_411520	TGGT1_220240	TGGT1_255330	TGGT1_245432
TGGT1_365480	TGGT1_212900	TGGT1_264200	TGGT1_246010
TGGT1_298050	TGGT1_286510	TGGT1_264150	TGGT1_246780
TGGT1_221630	TGGT1_286020	TGGT1_264140	TGGT1_246995
TGGT1_222060	TGGT1_285800	TGGT1_358240	TGGT1_248673
TGGT1_298040	TGGT1_283540	TGGT1_262970	TGGT1_250500
TGGT1_254820	TGGT1_239300	TGGT1_261650	TGGT1_250670
TGGT1_253710	TGGT1_239810	TGGT1_255170	TGGT1_251860
TGGT1_320740	TGGT1_240060	TGGT1_225098	TGGT1_278960
TGGT1_320160A	TGGT1_240810	TGGT1_224940	TGGT1_278170
TGGT1_211280	TGGT1_244400	TGGT1_223800	TGGT1_277060
TGGT1_319890	TGGT1_239010	TGGT1_223750	TGGT1_309760
TGGT1_318640	TGGT1_242820	TGGT1_211880	TGGT1_310420
TGGT1_279345	TGGT1_243940	TGGT1_234380	TGGT1_312690
TGGT1_267670	TGGT1_244710	TGGT1_235960	TGGT1_202180
TGGT1_266372	TGGT1_232000	TGGT1_215220	TGGT1_202010
TGGT1_265320	TGGT1_233153	TGGT1_275460	TGGT1_281380
TGGT1_264990	TGGT1_273980	TGGT1_228050	TGGT1_294410
TGGT1_289100	TGGT1_270670	TGGT1_224845	TGGT1_294595
TGGT1_291150	TGGT1_269320	TGGT1_224800	TGGT1_294980
TGGT1_306230	TGGT1_269315	TGGT1_224180	TGGT1_313660
TGGT1_267510	TGGT1_268035	TGGT1_224100	TGGT1_315420
TGGT1_266670	TGGT1_230705	TGGT1_306870	TGGT1_316510
TGGT1_266090	TGGT1_231992	TGGT1_309990	TGGT1_216410
TGGT1_265150	TGGT1_233180	TGGT1_311380	TGGT1_270230
TGGT1_287960	TGGT1_233610	TGGT1_311490	TGGT1_269310
TGGT1_290605	TGGT1_273720	TGGT1_311810	TGGT1_206290
TGGT1_210450	TGGT1_271250	TGGT1_311890	TGGT1_202930
TGGT1_305230	TGGT1_271070	TGGT1_313130	TGGT1_293780
TGGT1_305790	TGGT1_306550	TGGT1_306510	

<b>Continuacion anexo 16. C: 99 DEGs DOWN NEG RH 16</b>			
TGGT1_267980	TGGT1_232320	TGGT1_289920	TGGT1_234540
TGGT1_220900	TGGT1_271270	TGGT1_293720	TGGT1_236060
TGGT1_221250	TGGT1_269310	TGGT1_293430	TGGT1_310220
TGGT1_222100	TGGT1_205370	TGGT1_294790	TGGT1_310240
TGGT1_297070	TGGT1_205360	TGGT1_321650	TGGT1_311770
TGGT1_253100	TGGT1_203930	TGGT1_210095	TGGT1_313380
TGGT1_253140	TGGT1_281590	TGGT1_287040	TGGT1_316340
TGGT1_320515	TGGT1_282070	TGGT1_285930	TGGT1_216460
TGGT1_320030	TGGT1_205680	TGGT1_212770	TGGT1_310420
TGGT1_211280	TGGT1_204880	TGGT1_213255	TGGT1_313780
TGGT1_301420	TGGT1_202200	TGGT1_286600	TGGT1_315123
TGGT1_319890	TGGT1_201170	TGGT1_286020	TGGT1_315470
TGGT1_318525	TGGT1_281960	TGGT1_244080	TGGT1_315750
TGGT1_210820	TGGT1_255450	TGGT1_244720	TGGT1_316260
TGGT1_279420	TGGT1_358240	TGGT1_243200	TGGT1_219170
TGGT1_266630	TGGT1_261740	TGGT1_243930	TGGT1_217630
TGGT1_264990	TGGT1_258360	TGGT1_244250	TGGT1_408550
TGGT1_210420	TGGT1_256030	TGGT1_229280	TGGT1_278815
TGGT1_305270	TGGT1_225690	TGGT1_230340	TGGT1_277230
TGGT1_279350	TGGT1_235370	TGGT1_233490	TGGT1_218270
TGGT1_266720	TGGT1_235690	TGGT1_271260	TGGT1_217410
TGGT1_266670	TGGT1_214430	TGGT1_269320	TGGT1_245440
TGGT1_266090	TGGT1_225300	TGGT1_268182	TGGT1_248445
TGGT1_289910	TGGT1_224710	TGGT1_230350	TGGT1_278460
TGGT1_232020	TGGT1_224130	TGGT1_224000	



<b>Continuación anexo 16. D: 90 DEGs hipotéticas NEG RH 16 UP</b>			
TGGT1_291005	TGGT1_321610	TGGT1_286190	TGGT1_269670
TGGT1_207350	TGGT1_239752	TGGT1_287270	TGGT1_249890
TGGT1_309610	TGGT1_320525	TGGT1_232500	TGGT1_242260
TGGT1_309865	TGGT1_265770	TGGT1_286670	TGGT1_313710
TGGT1_217370	TGGT1_229030	TGGT1_410390	TGGT1_212940
TGGT1_222270	TGGT1_320750	TGGT1_312500	TGGT1_301460
TGGT1_224570	TGGT1_275430	TGGT1_293780	TGGT1_313495
TGGT1_237880	TGGT1_236800	TGGT1_237240	TGGT1_286050
TGGT1_260410	TGGT1_233870	TGGT1_229200	TGGT1_248180
TGGT1_285210	TGGT1_261650	TGGT1_286910	TGGT1_313640
TGGT1_216700	TGGT1_315360	TGGT1_242030	TGGT1_298010
TGGT1_282150	TGGT1_289890	TGGT1_223010	TGGT1_310560
TGGT1_319590	TGGT1_260490	TGGT1_213580	TGGT1_320530B
TGGT1_214540	TGGT1_248570	TGGT1_263440	TGGT1_221840
TGGT1_321430	TGGT1_311740	TGGT1_221675B	TGGT1_239290
TGGT1_238930	TGGT1_270130	TGGT1_231200	TGGT1_310730
TGGT1_253350	TGGT1_203290	TGGT1_237170	TGGT1_226670
TGGT1_209755B	TGGT1_231360	TGGT1_213790	TGGT1_258820
TGGT1_239340	TGGT1_230510	TGGT1_252310	TGGT1_212735
TGGT1_261610	TGGT1_257540	TGGT1_319580	TGGT1_294430
TGGT1_222300	TGGT1_272660	TGGT1_205100	TGGT1_209200

TGGT1_261970	TGGT1_262450	TGGT1_321590	TGGT1_205640
TGGT1_209700	TGGT1_277940		

Continuación anexo 16 . E: 301DEGs DOWN hipotéticas NEG RH 06					
TGGT1_296340	TGGT1_210820	TGGT1_220380	TGGT1_232320	TGGT1_264210	TGGT1_312700
TGGT1_220650	TGGT1_279420	TGGT1_212770	TGGT1_233157	TGGT1_263135	TGGT1_313030
TGGT1_410790	TGGT1_266630	TGGT1_213100	TGGT1_274180	TGGT1_261955A	TGGT1_313370
TGGT1_360320	TGGT1_266435	TGGT1_213255	TGGT1_273995	TGGT1_261740	TGGT1_313380
TGGT1_287430	TGGT1_265420	TGGT1_213920	TGGT1_273850	TGGT1_258970	TGGT1_313430
TGGT1_296231	TGGT1_264990	TGGT1_287235	TGGT1_272155	TGGT1_258360	TGGT1_313940
TGGT1_411500	TGGT1_264830	TGGT1_286230	TGGT1_271370	TGGT1_257550	TGGT1_314265
TGGT1_358120	TGGT1_287970	TGGT1_285780	TGGT1_271270	TGGT1_257070	TGGT1_315100
TGGT1_221250	TGGT1_288280	TGGT1_285650	TGGT1_270150	TGGT1_256030	TGGT1_316710
TGGT1_297120	TGGT1_289120	TGGT1_238390	TGGT1_269340	TGGT1_227980	TGGT1_216285
TGGT1_297410	TGGT1_289370	TGGT1_238410	TGGT1_268400	TGGT1_227880	TGGT1_215950
TGGT1_220930	TGGT1_291075	TGGT1_239050	TGGT1_268260	TGGT1_226690	TGGT1_309910
TGGT1_221690	TGGT1_291170	TGGT1_240365	TGGT1_268240	TGGT1_226660	TGGT1_310210
TGGT1_222100	TGGT1_210345	TGGT1_242080	TGGT1_360740	TGGT1_225200	TGGT1_310235
TGGT1_222330	TGGT1_305270	TGGT1_242740	TGGT1_200410	TGGT1_225120	TGGT1_310650
TGGT1_222440	TGGT1_306010	TGGT1_244080	TGGT1_280670	TGGT1_225105	TGGT1_311070
TGGT1_297070	TGGT1_279320	TGGT1_244130	TGGT1_280522	TGGT1_224980	TGGT1_311140
TGGT1_297180	TGGT1_288265	TGGT1_244230	TGGT1_280400	TGGT1_224070	TGGT1_312670
TGGT1_297690	TGGT1_289150	TGGT1_244260	TGGT1_205370	TGGT1_365100	TGGT1_313780
TGGT1_297790	TGGT1_289910	TGGT1_244720	TGGT1_205360	TGGT1_235370	TGGT1_314515
TGGT1_297830	TGGT1_290225	TGGT1_238895	TGGT1_203930	TGGT1_235690	TGGT1_314670
TGGT1_252450	TGGT1_292070	TGGT1_239410	TGGT1_203300	TGGT1_235720	TGGT1_315123
TGGT1_253370	TGGT1_305470	TGGT1_242670	TGGT1_203250	TGGT1_236850	TGGT1_315290
TGGT1_253830	TGGT1_293030	TGGT1_243200	TGGT1_202730	TGGT1_237270	TGGT1_315470
TGGT1_253990	TGGT1_293270	TGGT1_244250	TGGT1_202520	TGGT1_214430	TGGT1_360650
TGGT1_254290	TGGT1_293330	TGGT1_229280	TGGT1_281590	TGGT1_227320	TGGT1_316260
TGGT1_252880B	TGGT1_293540	TGGT1_229770	TGGT1_282070	TGGT1_226670	TGGT1_216053
TGGT1_252880A	TGGT1_294970	TGGT1_229900	TGGT1_206540	TGGT1_226350	TGGT1_299995
TGGT1_253100	TGGT1_295620	TGGT1_230230	TGGT1_206460	TGGT1_225000	TGGT1_217360
TGGT1_253140	TGGT1_294025	TGGT1_230340	TGGT1_205680	TGGT1_224710	TGGT1_217530
TGGT1_253560	TGGT1_294400	TGGT1_230850	TGGT1_205050	TGGT1_224680	TGGT1_217630
TGGT1_254135	TGGT1_294680	TGGT1_230900	TGGT1_204880	TGGT1_224540B	TGGT1_245580
TGGT1_254910	TGGT1_294730	TGGT1_230940	TGGT1_204270	TGGT1_224540A	TGGT1_247450
TGGT1_254960	TGGT1_294790	TGGT1_233370	TGGT1_204150	TGGT1_224140	TGGT1_248720
TGGT1_299250	TGGT1_295380	TGGT1_233430	TGGT1_203682	TGGT1_224000	TGGT1_250700
TGGT1_299130	TGGT1_207750	TGGT1_233490	TGGT1_203480	TGGT1_234400	TGGT1_251857
TGGT1_320515	TGGT1_208510	TGGT1_273080	TGGT1_202450	TGGT1_234540	TGGT1_278815
TGGT1_320470	TGGT1_321650	TGGT1_271400	TGGT1_202200	TGGT1_235420	TGGT1_308010
TGGT1_320080	TGGT1_321600	TGGT1_271260	TGGT1_201860	TGGT1_235940	TGGT1_308075
TGGT1_318390	TGGT1_212780	TGGT1_271000	TGGT1_201240	TGGT1_236060	TGGT1_218500
TGGT1_318380	TGGT1_213115	TGGT1_270720	TGGT1_281575	TGGT1_237290	TGGT1_218270
TGGT1_211600	TGGT1_213560	TGGT1_269075	TGGT1_281960	TGGT1_214510	TGGT1_218000
TGGT1_211280	TGGT1_213790	TGGT1_268182	TGGT1_262950	TGGT1_214750	TGGT1_217610
TGGT1_301420	TGGT1_287240	TGGT1_229260	TGGT1_261960	TGGT1_214990	TGGT1_245740
TGGT1_319520	TGGT1_286928	TGGT1_230000	TGGT1_260580	TGGT1_215550	TGGT1_246450
TGGT1_318525	TGGT1_286540	TGGT1_230350	TGGT1_259060	TGGT1_309720	TGGT1_246610
TGGT1_318360	TGGT1_220208	TGGT1_230860	TGGT1_258860	TGGT1_309920	TGGT1_247040
TGGT1_318290	TGGT1_277880	TGGT1_230870	TGGT1_257970	TGGT1_310240	TGGT1_248445
TGGT1_211660	TGGT1_277490	TGGT1_232020	TGGT1_257430	TGGT1_311770	TGGT1_248900
TGGT1_278580	TGGT1_249570	TGGT1_232260	TGGT1_255450	TGGT1_311905	TGGT1_249540
TGGT1_278130					

Continuacion anexo 16. F: 212 DEGs UP hipoteticas NEG RH 06 UP				
TGGT1_322110	TGGT1_288945	TGGT1_271250	TGGT1_255490	TGGT1_277560
TGGT1_212725	TGGT1_289000	TGGT1_271070	TGGT1_255170	TGGT1_276830
TGGT1_212735	TGGT1_210490	TGGT1_270230	TGGT1_228370	TGGT1_276810
TGGT1_410090	TGGT1_210450	TGGT1_270130	TGGT1_225098	TGGT1_218910
TGGT1_323320	TGGT1_305910	TGGT1_269130	TGGT1_224940	TGGT1_218350
TGGT1_323310	TGGT1_306550	TGGT1_281030	TGGT1_224570	TGGT1_217370
TGGT1_301690	TGGT1_293780	TGGT1_206320	TGGT1_223800	TGGT1_245432
TGGT1_411270	TGGT1_293790	TGGT1_206290	TGGT1_211880	TGGT1_246995
TGGT1_212420	TGGT1_294410	TGGT1_202440	TGGT1_235960	TGGT1_248750
TGGT1_411390	TGGT1_294980	TGGT1_202010	TGGT1_237170	TGGT1_249010
TGGT1_365480	TGGT1_295100	TGGT1_281380	TGGT1_225350	TGGT1_249890
TGGT1_222030	TGGT1_209700	TGGT1_282030	TGGT1_225090	TGGT1_250720
TGGT1_297270	TGGT1_209720	TGGT1_282130	TGGT1_224845	TGGT1_278960
TGGT1_297340	TGGT1_209755B	TGGT1_206300	TGGT1_224180	TGGT1_278170
TGGT1_297710	TGGT1_321590	TGGT1_205740	TGGT1_224100	TGGT1_277930
TGGT1_297900	TGGT1_321430	TGGT1_204350	TGGT1_236800	TGGT1_277060
TGGT1_298050	TGGT1_209020	TGGT1_204010	TGGT1_237450	TGGT1_248430
TGGT1_222060	TGGT1_213580	TGGT1_204000	TGGT1_214540	TGGT1_249040
TGGT1_222080	TGGT1_213880	TGGT1_203600	TGGT1_311810	TGGT1_249660
TGGT1_222260	TGGT1_287270	TGGT1_203350	TGGT1_313130	TGGT1_249790
TGGT1_298040	TGGT1_286570	TGGT1_203290	TGGT1_313250	TGGT1_278840
TGGT1_276220	TGGT1_285210	TGGT1_202445	TGGT1_313640	TGGT1_262660
TGGT1_253350	TGGT1_213067	TGGT1_202430	TGGT1_313660	TGGT1_262450
TGGT1_254820	TGGT1_286760	TGGT1_202190	TGGT1_314480	TGGT1_261650
TGGT1_252280	TGGT1_286510	TGGT1_264220	TGGT1_315510	TGGT1_258820
TGGT1_252310	TGGT1_286050	TGGT1_263633	TGGT1_316510	TGGT1_257000
TGGT1_252630	TGGT1_238150	TGGT1_263240	TGGT1_216410	TGGT1_232650
TGGT1_253710	TGGT1_239752	TGGT1_262900	TGGT1_309860	TGGT1_233180
TGGT1_320750	TGGT1_240400	TGGT1_261730	TGGT1_310250	TGGT1_233610
TGGT1_320530A	TGGT1_240520	TGGT1_261075	TGGT1_310840	TGGT1_233870
TGGT1_320530B	TGGT1_240810	TGGT1_260490	TGGT1_312500	TGGT1_273720
TGGT1_211070	TGGT1_244400	TGGT1_260400	TGGT1_312618	TGGT1_304930
TGGT1_210810	TGGT1_238930	TGGT1_259600	TGGT1_312820	TGGT1_279340
TGGT1_318640	TGGT1_240580	TGGT1_258730	TGGT1_313055	TGGT1_265030
TGGT1_211030	TGGT1_242820	TGGT1_258590	TGGT1_313710	TGGT1_287960
TGGT1_301460	TGGT1_243940	TGGT1_257755	TGGT1_216700	TGGT1_288550
TGGT1_237880	TGGT1_272660	TGGT1_257540	TGGT1_300160	TGGT1_248180
TGGT1_279410	TGGT1_272383	TGGT1_256700	TGGT1_219742	TGGT1_248190
TGGT1_279345	TGGT1_271320	TGGT1_255400	TGGT1_218340	TGGT1_262970
TGGT1_267670	TGGT1_270220	TGGT1_264200	TGGT1_217555	TGGT1_262935
TGGT1_266372	TGGT1_269315	TGGT1_264150	TGGT1_245520	TGGT1_230705
TGGT1_265170	TGGT1_268790	TGGT1_263440	TGGT1_245980	TGGT1_291150
TGGT1_264748	TGGT1_230510			



**ANEXO 18.** DEGs de *T. gondii* expresados a la baja en la interacción con PBMCs crónicos entre la primera y la sexta hora pi.

gene	log2(fold_change)	Product Description
TGGT1_363030	-2.12502	rhopty protein ROP8
TGGT1_295110	-2.12262	rhopty protein ROP7
TGGT1_411430	-2.021	rhopty protein ROP5
TGGT1_356400	-1.92934	cAMP-dependent protein kinase
TGGT1_297960B	-2.19935	rhopty neck protein RON6
TGGT1_297960A	-2.33013	rhopty neck protein RON6
TGGT1_253380	-2.01461	AP2 domain transcription factor AP2III-2
TGGT1_318470	-2.79346	AP2 domain transcription factor AP2IV-4
TGGT1_291960	-2.21086	rhopty kinase family protein ROP40 (incomplete catalytic triad)
TGGT1_305590	-2.63203	ABC transporter transmembrane region domain-containing protein
TGGT1_306060	-2.09957	rhopty neck protein RON8
TGGT1_293240	-1.49462	triacylglycerol lipase
TGGT1_294610	-1.91644	putative histone lysine methyltransferase, SET
TGGT1_295125	-2.35018	rhopty protein ROP4
TGGT1_209050	-2.42609	Tyrosine kinase-like (TKL) protein
TGGT1_286590	-1.88353	microtubule associated protein SPM2
TGGT1_239830	-2.10396	TBC domain-containing protein
TGGT1_269885A	-2.61043	rhopty metalloprotease toxolysin TLN1
TGGT1_269460	-1.59002	Ser/Thr phosphatase family protein
TGGT1_230150	-1.45253	ChAPs (Chs5p-Arf1p-binding proteins) protein
TGGT1_257470	-1.69273	myosin J
TGGT1_258700	-2.11256	transporter, major facilitator family protein
TGGT1_258660	-1.7912	rhopty protein ROP6
TGGT1_227810	-1.92977	rhopty kinase family protein ROP11 (incomplete catalytic triad)
TGGT1_223920	-2.46854	rhopty neck protein RON3
TGGT1_237090	-1.78529	AP2 domain transcription factor AP2X-5
TGGT1_215775	-2.11065	rhopty protein ROP8
TGGT1_215570	-1.5687	AP2 domain transcription factor AP2X-11
TGGT1_310010	-1.54797	rhopty neck protein RON1
TGGT1_312100	-2.37377	plasma membrane-type Ca(2+)-ATPase A1 PMCAA1
TGGT1_311470	-2.05484	rhopty neck protein RON5
TGGT1_315210	-2.04025	putative rhopty protein
TGGT1_300100	-2.44042	rhopty neck protein RON2
TGGT1_251740	-1.86165	AP2 domain transcription factor AP2XII-9

**ANEXO 19.** Lista de los 145 DEGs sobre expresados en *T. gondii* en la interacción con PBMCs-h negativos en la 0 vs 1hpi.

gene	log2(fold_change)	Product Description	gene	log2(fold_change)	Product Description
TGGT1_240550	inf	putative copper chaperone COX17-1	TGGT1_286630	1.38555	redoxin domain-containing protein
TGGT1_238470	inf	SAG-related sequence SRS22C	TGGT1_289230	1.38509	putative 50S ribosomal protein L12
TGGT1_258575	inf	Dpy-30 motif protein	TGGT1_272570	1.37696	dihydrouridine synthase (dus) protein
TGGT1_251870	inf	histone H2Bb	TGGT1_246070	1.37672	SAG-related sequence SRS56
TGGT1_266610	4.53538	Kazal-type serine protease inhibitor domain-containing protein	TGGT1_294250	1.37205	WD domain, G-beta repeat-containing protein
TGGT1_249150	3.1203	PAN domain-containing protein	TGGT1_239600	1.37199	rhostry kinase family protein ROP23 (incomplete catalytic triad)
TGGT1_219348	3.08718	SAG-related sequence SRS55M	TGGT1_226800	1.353	eukaryotic glutathione synthase, atp binding domain-containing protein
TGGT1_411360	3.04912	rhostry kinase family protein	TGGT1_226300	1.34691	2,4-dienoyl CoA reductase 2, peroxisomal family protein
TGGT1_356400	2.87288	cAMP-dependent protein kinase	TGGT1_313190	1.34364	Rab18/RabC-family small GTPase
TGGT1_411550	2.79348	Toxoplasma gondii family A protein	TGGT1_266730	1.34115	leucyl-tRNA synthetase (Leu952)
TGGT1_266340	2.79219	Toxoplasma gondii family A protein	TGGT1_255370	1.33258	TIC20 protein
TGGT1_278090	2.73623	Toxoplasma gondii family A protein	TGGT1_209140	1.31781	anti-silencing protein, ASF1 family protein
TGGT1_410600	2.70547	putative cAMP-dependent protein kinase	TGGT1_272430	1.31444	MAC/Perforin domain-containing protein
TGGT1_309300	2.65361	SAG-related sequence SRS55A	TGGT1_411470	1.31321	putative transmembrane protein
TGGT1_278380	2.62192	Toxoplasma gondii family A protein	TGGT1_278240	1.29372	Zn-finger in Ran binding protein and others domain-containing protein
TGGT1_231400B	2.4988	tubulin/FtsZ family, GTPase domain-containing protein	TGGT1_226310	1.29311	zinc finger (CCH type) motif-containing protein
TGGT1_209985	2.49837	cAMP-dependent protein kinase	TGGT1_279450	1.29189	putative adenylosuccinate synthetase
TGGT1_266330	2.48665	Toxoplasma gondii family A protein	TGGT1_208030	1.28832	microneme protein MIC4
TGGT1_221310	2.34934	aminopeptidase N protein	TGGT1_300130	1.26988	apical membrane antigen 1 domain-containing protein
TGGT1_233040	2.32846	3'5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase domain-containing protein	TGGT1_409600	1.26449	rhostry kinase family protein
TGGT1_231400A	2.27185	tubulin/FtsZ family, GTPase domain-containing protein	TGGT1_210830	1.26254	RII1 family protein
TGGT1_267150	2.24753	SAG-related sequence SRS38C	TGGT1_315885	1.25867	putative glycosyltransferase
TGGT1_274170	2.23441	protein kinase (incomplete catalytic triad)	TGGT1_238040A	1.25687	protein disulfide-isomerase domain-containing protein
TGGT1_252640	2.16704	P-type ATPase PMA1	TGGT1_293510	1.25671	poly(ADP-ribose) polymerase and DNA-Ligase Zn-finger region domain-containing protein
TGGT1_232580	2.15871	propionate-CoA ligase	TGGT1_263470	1.25541	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase UCHL3
TGGT1_272440	2.14579	RNA recognition motif-containing protein	TGGT1_265010	1.25347	glutamate 5-kinase domain-containing protein
TGGT1_258550	2.09975	SAG-related sequence SRS28	TGGT1_202460	1.24395	diacylglycerol kinase accessory domain (presumed) domain-containing protein
TGGT1_278400	2.0697	Toxoplasma gondii family A protein	TGGT1_286720	1.24212	heat shock protein HSP28
TGGT1_264660	2.06293	SAG-related sequence SRS44	TGGT1_262910	1.23569	putative NADH-cytochrome b5 reductase 1
TGGT1_301350	2.05068	SNARE associated protein	TGGT1_229140	1.23105	Maoc family domain-containing protein
TGGT1_244450	2.02583	protein phosphatase 2C domain-containing protein	TGGT1_265830	1.21322	phosphodiesterase/alkaline phosphatase D family protein
TGGT1_233065	2.02249	3'5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase domain-containing protein	TGGT1_306330	1.20343	phospholipase
TGGT1_244180	2.01491	microneme-like protein	TGGT1_288600	1.20126	WD domain, G-beta repeat-containing protein
TGGT1_278390	2.00461	Toxoplasma gondii family A protein	TGGT1_281675	1.19664	putative protein kinase
TGGT1_238200	1.95587	alpha/beta hydrolase fold domain-containing protein	TGGT1_233030	1.18112	gliding-associated protein GAP70
TGGT1_308093	1.93269	rhostry kinase family protein (incomplete catalytic triad)	TGGT1_214080	1.17918	toxofilin
TGGT1_212410	1.92204	dense granule protein GRA11	TGGT1_233860	1.17586	DALR anticodon binding domain-containing protein
TGGT1_278120	1.88967	SCP family extracellular subfamily protein	TGGT1_238230	1.17074	Ser/Thr phosphatase family protein
TGGT1_266860	1.84979	BTB/POZ domain-containing protein	TGGT1_320190	1.16169	SAG-related sequence SRS16B
TGGT1_205410	1.84794	RNA pseudouridine synthase superfamily protein	TGGT1_240840	1.14807	histone lysine demethylase JmJc N066
TGGT1_319360	1.80305	SAG-related sequence SRS17A	TGGT1_297080	1.13849	pyridoxal kinase
TGGT1_314250	1.77202	bradyzoite rhostry protein BRP1	TGGT1_242790A	1.12294	putative trichohyalin
TGGT1_318675	1.74968	3'5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase domain-containing protein	TGGT1_243340	1.11992	atypical MEK-related kinase (incomplete catalytic triad)
TGGT1_269300	1.74962	lipase	TGGT1_312380	1.11838	tetratricopeptide repeat-containing protein
TGGT1_225290	1.74446	GDA1/CD39 (nucleoside phosphatase) family protein	TGGT1_214580	1.11834	tetratricopeptide repeat-containing protein
TGGT1_237800	1.73586	dense granule protein GRA11	TGGT1_258800	1.11821	rhostry kinase family protein ROP31
TGGT1_290970	1.73026	8-amino-7-oxononanoate synthase	TGGT1_243480	1.11057	putative 50S ribosomal protein L3
TGGT1_278080	1.67297	Toxoplasma gondii family A protein	TGGT1_410370	1.10848	putative transmembrane protein
TGGT1_321480	1.66418	SAG-related sequence SRS12B	TGGT1_274070	1.0886	Thif family protein
TGGT1_222370	1.66273	SAG-related sequence SRS13	TGGT1_246920	1.08826	glutathione reductase
TGGT1_286150	1.6578	PAN/Apple domain-containing protein	TGGT1_254900	1.08561	putative proteasome subunit beta type 2
TGGT1_244490	1.61482	putative insulinysin	TGGT1_249160	1.07789	UAA transporter family protein
TGGT1_242240	1.60607	rhostry kinase family protein ROP19A	TGGT1_211720	1.07416	AP2 domain transcription factor AP2IV-5
TGGT1_278370	1.58061	Toxoplasma gondii family A protein	TGGT1_304670	1.07382	leucine rich repeat-containing protein
TGGT1_215775	1.55157	rhostry protein ROP8	TGGT1_305980	1.07045	pyruvate dehydrogenase complex subunit PDH-E3i
TGGT1_226090	1.54888	DEAD/DEAH box helicase domain-containing protein	TGGT1_210778	1.06909	hemimethylated DNA binding domain-containing protein
TGGT1_278110	1.53639	1,3-beta-glucan synthase component protein	TGGT1_213520	1.06503	peptidase M20D, amidohydrolase
TGGT1_267380	1.52156	UDP-galactose transporter subfamily protein	TGGT1_274110	1.06114	glycoprotease family protein
TGGT1_312350	1.52151	putative IMPACT	TGGT1_270920	1.06033	rhostry kinase family protein ROP32
TGGT1_359770	1.50288	SAG-related sequence protein SRS22E	TGGT1_220080	1.05463	Toxoplasma gondii family C protein
TGGT1_310870	1.49744	putative integral membrane protein	TGGT1_322100	1.05289	myosin-light-chain kinase
TGGT1_320230	1.47416	SAG-related sequence SRS15C	TGGT1_239620	1.05099	5'-nucleotidase, C-terminal domain-containing protein
TGGT1_243510	1.4721	OTU family cysteine protease	TGGT1_280470	1.0475	AP2 domain transcription factor AP2Vila-1
TGGT1_202580	1.47137	ATPase, AAA family protein	TGGT1_257730	1.04099	putative methionine aminopeptidase, type I
TGGT1_246930	1.45603	calmodulin CAM1	TGGT1_242020	1.03492	mannosyl-oligosaccharide glucosidase
TGGT1_319560	1.45504	microneme protein MIC3	TGGT1_321800	1.02831	EGF family domain-containing protein
TGGT1_291670	1.44711	DEAD/DEAH box helicase domain-containing protein	TGGT1_320180	1.02431	SAG-related sequence SRS16C
TGGT1_410590	1.43762	cAMP-dependent protein kinase	TGGT1_307850	1.01982	6-phosphogluconate dehydrogenase
TGGT1_270650	1.42606	deoxyribose-phosphate aldolase	TGGT1_237890	1.00803	calcium-dependent protein kinase CDPK4
TGGT1_227430	1.4145	transmembrane amino acid transporter protein	TGGT1_251880	1.00412	tRNA synthetases class I family protein
TGGT1_251930	1.41173	enoyl-acyl carrier reductase ENR	TGGT1_320480	1.00143	Rab11b
TGGT1_253790	1.40626	zinc finger (CCH type) motif-containing protein			
TGGT1_318610	1.40528	AP2 domain transcription factor AP2IV-3			
TGGT1_232390	1.39029	18S rRNA biogenesis protein RCL1 protein			

**ANEXO 20. DEGs (169) de *Toxoplasma gondii* presentes en la primera hora de interacción con PBMCs-h negativos, posterior a la eliminación de las DEGs “hipotéticos”.**

gene	Product Description	TGGT1	Product Description
TGGT1_200230	microneme protein MIC17C	TGGT1_203170	OB-fold nucleic acid binding domain-containing protein
TGGT1_200240	microneme protein MIC17B	TGGT1_202850	ATP-binding domain-containing protein
TGGT1_221922	Nifu family domain-containing protein	TGGT1_202640	RNA pseudouridine synthase superfamily protein
TGGT1_222660	leucine rich repeat-containing protein	TGGT1_201230	kinesin motor domain-containing protein
TGGT1_297780	ATPase/histidine kinase/DNA gyrase B/HSP90 domain-containing protein	TGGT1_201120	ELMO/CED-12 family protein
TGGT1_222430	HECT-domain (Ubiquitin-transferase) domain-containing protein	TGGT1_281930	SAG-related sequence SRS39
TGGT1_276180	histone acetyltransferase TAF1/250	TGGT1_280500	inorganic anion transporter, sulfate permease (SuIP) family protein
TGGT1_253060	WD domain, G-beta repeat-containing protein	TGGT1_304650	histidine acid phosphatase superfamily protein
TGGT1_253070	hydrolase, TatD family protein	TGGT1_206610	pyruvate dehydrogenase complex subunit PDH-E2
TGGT1_253090	DEAD/DEAH box helicase domain-containing protein	TGGT1_204160	GYF domain-containing protein
TGGT1_254880	Alpha-galactosidase	TGGT1_204140	PHD-finger domain-containing protein
TGGT1_299190	B-box zinc finger domain-containing protein	TGGT1_202490	AP2 domain transcription factor AP2Vila-7
TGGT1_276230	Toxoplasma gondii family B protein	TGGT1_202280	WD domain, G-beta repeat-containing protein
TGGT1_275610	protein kinase, other	TGGT1_201220	zinc finger protein
TGGT1_252210	pentatricopeptide repeat domain-containing protein	TGGT1_261240	histone H3
TGGT1_252465	radical SAM domain-containing protein	TGGT1_260270	HEAT repeat-containing protein
TGGT1_253130	transporter, major facilitator family protein	TGGT1_259270	SAG-related sequence SRS26E
TGGT1_254540	CDP-alcohol phosphatidyltransferase superfamily protein	TGGT1_259230	site-specific recombinase, phage integrase family protein
TGGT1_299150	AP2 domain transcription factor AP2III-3	TGGT1_259070	acetyltransferase, GNAT family protein
TGGT1_320620	queuine tRNA ribosyl transferase	TGGT1_256920	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-Kinase
TGGT1_318470	AP2 domain transcription factor AP2IV-4	TGGT1_256025	SPEF1 family protein
TGGT1_211040	Sec61beta family protein	TGGT1_255390	HEAT repeat-containing protein
TGGT1_210781	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	TGGT1_260150	tetratricopeptide repeat-containing protein
TGGT1_237860	protein kinase domain-containing protein	TGGT1_258790	zinc finger, C3HC4 type (RING finger) domain-containing protein
TGGT1_319860	DNA polymerase family B protein	TGGT1_258110	N-acetylglucosaminylphosphatidylinositol deacetylase
TGGT1_266070	ribosomal protein RPL31	TGGT1_257625	tetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase, NAD(P)-binding domain-containing protein
TGGT1_265780	flagellar/basal body protein	TGGT1_257290	RNA 2'-phosphotransferase, Tpt1/KptA family protein
TGGT1_289170	adenylate and guanylate cyclase catalytic domain-containing protein	TGGT1_226480	DNA topoisomerase family protein
TGGT1_289490	serine/threonine specific protein phosphatase	TGGT1_225110	AP2 domain transcription factor AP2X-2
TGGT1_289710	AP2 domain transcription factor AP2IX-5	TGGT1_224310	DHHC zinc finger domain-containing protein
TGGT1_290630	AP2 domain transcription factor AP2IX-7	TGGT1_224230	AP2 domain transcription factor AP2X-3
TGGT1_291050	putative histone kinase SNF1	TGGT1_234440	putative aminotransferase
TGGT1_306000	AP2 domain transcription factor AP2IX-8	TGGT1_234900	PHD-finger domain-containing protein
TGGT1_266390	DNA mismatch repair protein, C-terminal domain-containing protein	TGGT1_237090	AP2 domain transcription factor AP2X-5
TGGT1_288720	ribosomal protein RPL10	TGGT1_237210	Tyrosine kinase-like (TKL) protein
TGGT1_290020	cyclin dependent kinase binding protein	TGGT1_237280	TLD protein
TGGT1_290200	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase, alpha-helical domain-containing protein	TGGT1_214230	Dopey, N-terminal domain-containing protein
TGGT1_290580	ATP-binding cassette G family transporter ABCG89	TGGT1_214920	putative GPI-anchored wall transfer protein GWT1
TGGT1_292140	NIMA-related protein kinase NIMA1	TGGT1_227900	AP2 domain transcription factor AP2X-1
TGGT1_292170	putative histone lysine methyltransferase, SET	TGGT1_224480	putative cell-cycle-associated protein kinase CLK
TGGT1_292200	RNA recognition motif-containing protein	TGGT1_236220	PCI domain-containing protein
TGGT1_305330	cyclin, N-terminal domain-containing protein	TGGT1_237410	protein phosphatase 2C domain-containing protein
TGGT1_293240	triacylglycerol lipase	TGGT1_215100	PP-loop family protein
TGGT1_293260	ATPase/histidine kinase/DNA gyrase B/HSP90 domain-containing protein	TGGT1_309265	oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family protein
TGGT1_294380	PP-loop domain-containing protein	TGGT1_309820	ribosomal protein RPL11
TGGT1_207760	DnaJ C terminal region domain-containing protein	TGGT1_311060	metal-dependent phosphohydrolase HD domain-containing protein
TGGT1_208050	putative ABC transporter	TGGT1_313370	regulator of chromosome condensation (RCC1) repeat-containing protein
TGGT1_321450	Myb family DNA-binding domain-containing protein	TGGT1_316680	RNA pseudouridine synthase superfamily protein
TGGT1_208820	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	TGGT1_216740A	riboflavin kinase
TGGT1_209130	regulator of chromosome condensation (RCC1) repeat-containing protein	TGGT1_216710	transporter, major facilitator family protein
TGGT1_209650B	RNA-directed DNA polymerase	TGGT1_216620	EF hand domain-containing protein
TGGT1_213060	WD domain, G-beta repeat-containing protein	TGGT1_215990	putative helicase
TGGT1_213325	TBC domain-containing protein	TGGT1_309120	ribosomal protein RPL4
TGGT1_213392	surface antigen repeat-containing protein	TGGT1_310190	PIK3R4 kinase-related protein (incomplete catalytic triad)
TGGT1_286220	GDP-L-fucose synthetase	TGGT1_312090	ribosomal protein RPL23
TGGT1_284010	5'-3' exonuclease, N-terminal resolvase family domain-containing protein	TGGT1_312570	CMGC kinase, MAPK family (ERK) MAPK-1
TGGT1_220230B	leucine rich repeat-containing protein	TGGT1_312622	DUF803 domain-containing protein
TGGT1_213340	GMC oxidoreductase	TGGT1_316560	Toxoplasma gondii family D protein
TGGT1_213780	radical SAM domain-containing protein	TGGT1_216430	TBC domain-containing protein
TGGT1_287160	internal kinesin motor domain protein	TGGT1_300230	putative nuclease
TGGT1_286420B	putative elongation factor 1-alpha (EF-1-ALPHA)	TGGT1_300190	ribosomal protein RPL37A
TGGT1_243920	putative DNA replication licensing factor MCM5	TGGT1_300000	ribosomal protein RPL18
TGGT1_238460	SAG-related sequence SRS22B	TGGT1_218840	mts domain protein
TGGT1_240410	protein kinase (incomplete catalytic triad)	TGGT1_218580	RNA methyltransferase, TmH family protein
TGGT1_243570	ribosomal protein RPS26	TGGT1_217700	AP2 domain transcription factor AP2XII-2
TGGT1_244500	Tubulin-tyrosine ligase family protein	TGGT1_245680	ribosomal protein RPL21
TGGT1_229310	mediator complex subunit MED14	TGGT1_246000	large subunit ribosomal protein IMG2
TGGT1_229370	AP2 domain transcription factor AP2VIII-1	TGGT1_248240	leucine rich repeat-containing protein
TGGT1_229780	GHMP kinase, N-terminal domain-containing protein	TGGT1_248480	ribosomal protein RPS9
TGGT1_230080	DEAD/DEAH box helicase domain-containing protein	TGGT1_249620	histone deacetylase HDAC2
TGGT1_231080	ribosomal protein RPL38	TGGT1_278160	vesicle transport v-snare protein
TGGT1_232190	Sec7 domain-containing protein	TGGT1_277895	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase
TGGT1_273800	WD domain, G-beta repeat-containing protein	TGGT1_219100	cyclin-dependent kinase regulatory subunit protein
TGGT1_269460	Ser/Thr phosphatase family protein	TGGT1_218850	ribosomal protein RPS19
TGGT1_268600	DNA polymerase epsilon subunit B protein	TGGT1_218540	putative peptidase S15
TGGT1_229290	kelch repeat-containing protein	TGGT1_246200	zinc finger (CCCH type) motif-containing protein
TGGT1_229350	HEAT repeat-containing protein	TGGT1_248470	subtilisin SUB6
TGGT1_230150	ChAPs (Ch5p-Arf1p-binding proteins) protein	TGGT1_248530	FATC domain-containing protein
TGGT1_232370	CW-type Zinc Finger protein	TGGT1_250800	AP2 domain transcription factor AP2XII-8
TGGT1_232450	SWI2/SNF2-containing protein RAD54	TGGT1_278975	ICE family protease (caspase) p20 domain-containing protein
TGGT1_233090	XPG N-terminal domain-containing protein		
TGGT1_233120	AP2 domain transcription factor AP2VIII-2		
TGGT1_271200	AP2 domain transcription factor AP2VIII-5		
TGGT1_269180	MIF4G domain-containing protein		
TGGT1_322210	putative apocytochrome b		
TGGT1_280770	regulator of chromosome condensation (RCC1) repeat-containing protein		
TGGT1_206415	myosin K		
TGGT1_205558	NAC domain-containing protein		
TGGT1_204370	WD-40 repeat protein		



**ANEXO 21.** Lista de os 150 DEGs sobre expresados en *T. gondii* al interactuar con PBMCs-h negativos entre la primera y la sexta hpi.

150 DEGs sobre expresados en <i>Toxoplasma gondii</i> en PBMCs-h negativos en 1h vs 6hpi					
gene	log2(fold_change)	Product Description	gene	log2(fold_change)	Product Description
TGGT1_320770	inf	Toxoplasma gondii family B protein	TGGT1_301210	1.48268	putative NAD(P) transhydrogenase subunit beta
TGGT1_238960	inf	EF hand domain-containing protein	TGGT1_305980	1.48149	pyruvate dehydrogenase complex subunit PDH-E3l
TGGT1_245670	4.44413	pyruvate dehydrogenase complex subunit PDH-E1A1alpha	TGGT1_319860	1.47507	DNA polymerase family B protein
TGGT1_217740	4.23772	3-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase	TGGT1_225990	1.46814	acyl transferase domain-containing protein
TGGT1_218540	3.98437	putative peptidase S15	TGGT1_254365	1.45033	phosphatidate cytidyltransferase
TGGT1_253330	3.75115	Rhogtyr kinase family protein	TGGT1_253070	1.42575	hydrolase, TatD family protein
TGGT1_207140	3.55541	SAG-related sequence SRS49B	TGGT1_227970	1.40901	histone family DNA-binding protein
TGGT1_283702	3.52647	FATC domain-containing protein	TGGT1_209130	1.40736	regulator of chromosome condensation (RCC1) repeat-containing p
TGGT1_280580	3.05654	SAG-related sequence SRS35B	TGGT1_316300	1.40508	ATP-dependent DNA helicase, RecQ family protein
TGGT1_239530	2.97609	alanine-glyoxylate aminotransferase	TGGT1_237140	1.38681	putative ethylene inducible protein
TGGT1_252210	2.93166	pentatricopeptide repeat domain-containing protein	TGGT1_247485	1.37807	zinc finger, C3HC4 type (RING finger) domain-containing protein
TGGT1_218850	2.76835	ribosomal protein RPS9	TGGT1_260680	1.36855	putative small subunit DNA primase
TGGT1_226480	2.63299	DNA topoisomerase family protein	TGGT1_258790	1.34956	zinc finger, C3HC4 type (RING finger) domain-containing protein
TGGT1_240930	2.60791	MoaC family protein	TGGT1_225050	1.33776	putative adenosylhomocysteinase
TGGT1_292170	2.58572	putative histone lysine methyltransferase, SET	TGGT1_246100	1.3349	putative phosphodiesterase
TGGT1_218530	2.53135	proteasome-interacting thioredoxin domain-containing protein	TGGT1_266620	1.3306	thioredoxin domain-containing protein
TGGT1_206610	2.5177	pyruvate dehydrogenase complex subunit PDH-E2	TGGT1_221320	1.32304	acetyl-CoA carboxylase ACC1
TGGT1_264080	2.50286	acyl carrier protein ACP	TGGT1_264000	1.32093	aldehyde dehydrogenase
TGGT1_222020	2.4863	phosphoglycerate kinase PGKII	TGGT1_239320	1.32014	BolA family protein
TGGT1_284010	2.33507	5'-3' exonuclease, N-terminal resolvase family domain-containing protein	TGGT1_229290	1.3078	kelch repeat-containing protein
TGGT1_207160	2.32301	SAG-related sequence SRS49D	TGGT1_264660	1.30528	SAG-related sequence SRS44
TGGT1_220450	2.31501	ribonuclease HI protein	TGGT1_208560	1.30245	carrier superfamily protein
TGGT1_290580	2.30444	ATP-binding cassette G family transporter ABCG89	TGGT1_229020	1.30202	putative cell-cycle-associated protein kinase CDK
TGGT1_285700	2.29898	ubiquitin fusion degradation protein UFD1AP	TGGT1_252640	1.30173	P-type ATPase PMA1
TGGT1_227650	2.29248	putative microtubule-associated protein RP/EB family	TGGT1_248850	1.28836	methionine aminopeptidase
TGGT1_203170	2.27938	OB-fold nucleic acid binding domain-containing protein	TGGT1_236570	1.28699	lysine decarboxylase family protein
TGGT1_218810	2.26813	histidyl-tRNA synthetase	TGGT1_259070	1.28628	acetyltransferase, GNAT family protein
TGGT1_244510	2.24023	AP2 domain transcription factor AP2V1-3	TGGT1_289940	1.28137	uroporphyrinogen decarboxylase
TGGT1_231350	2.23197	glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase	TGGT1_226720	1.2738	translin family protein
TGGT1_320620	2.23152	queuine tRNA ribosyl transferase	TGGT1_254580	1.26812	UDP-galactose transporter family protein
TGGT1_271200	2.14735	AP2 domain transcription factor AP2VIII-5	TGGT1_243920	1.26445	putative DNA replication licensing factor MCM5
TGGT1_272900	2.08141	putative DNA repair protein RAD51	TGGT1_240410	1.26287	protein kinase (incomplete catalytic triad)
TGGT1_301160	2.0758	SAG-related sequence SRS19C	TGGT1_264650	1.25331	phosphoacetylglucosamine mutase
TGGT1_246690	2.06895	alpha amylase, catalytic domain-containing protein	TGGT1_259550	1.23634	dihydropterolate synthase
TGGT1_224170	2.06501	SAG-related sequence SRS60A	TGGT1_291030	1.23605	zinc finger, C3HC4 type (RING finger) domain-containing protein
TGGT1_266760	2.05645	isocitrate dehydrogenase	TGGT1_237860	1.22686	protein kinase domain-containing protein
TGGT1_231170	1.97127	RecF/RecN/SMC N terminal domain-containing protein	TGGT1_242340	1.20143	ribosomal protein RPS29
TGGT1_305950	1.96782	tetratricopeptide repeat-containing protein	TGGT1_295720	1.18889	putative sulfite oxidase
TGGT1_248530	1.94652	FATC domain-containing protein	TGGT1_294640	1.18207	ribonucleoside-diphosphate reductase large chain
TGGT1_290200	1.93356	NAD/NADP octopine/nopaline dehydrogenase, alpha-helical domain-containing p	TGGT1_313200	1.17401	leucine rich repeat-containing protein
TGGT1_230520	1.91782	putative cytophilin 1	TGGT1_209100	1.17224	PUB domain-containing protein
TGGT1_206415	1.91257	myosin K	TGGT1_225290	1.1701	GDA1/CD39 (nucleoside phosphatase) family protein
TGGT1_208740	1.88124	putative microneme protein	TGGT1_208820	1.16507	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase
TGGT1_312480	1.87499	putative uracil phosphoribosyltransferase FUR1	TGGT1_280690	1.16414	DNA polymerase epsilon subunit B protein
TGGT1_260420	1.86504	HEC/Ndc80p family protein	TGGT1_311690	1.15894	UBA1/TS-N domain-containing protein
TGGT1_270240	1.85493	MAG1 protein	TGGT1_305560	1.13673	Vps51/Vps67 protein
TGGT1_236220	1.85252	PCI domain-containing protein	TGGT1_235540	1.13037	putative eukaryotic initiation factor-2 beta
TGGT1_258380	1.85127	elongation factor p (ef-p) kow family domain-containing protein	TGGT1_205650	1.12953	AP2 domain transcription factor AP2VIIa-3
TGGT1_316700	1.84145	uridine kinase	TGGT1_233140	1.11905	putative deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase
TGGT1_238995	1.83221	ion channel protein	TGGT1_248950	1.11543	carrier superfamily protein
TGGT1_230080	1.81241	DEAD/DEAH box helicase domain-containing protein	TGGT1_237110	1.10377	putative replication factor C subunit 2
TGGT1_278080	1.80976	Toxoplasma gondii family A protein	TGGT1_309930	1.09794	melibiase subfamily protein
TGGT1_286220	1.79238	GDP-L-fucose synthetase	TGGT1_259920	1.08767	Nitric-oxide synthase
TGGT1_246800	1.76898	putative acylaminoacyl-peptidase	TGGT1_223258	1.07853	
TGGT1_318430	1.73534	malate dehydrogenase MDH	TGGT1_268600	1.0689	DNA polymerase epsilon subunit B protein
TGGT1_202510	1.72548	multi-pass transmembrane protein	TGGT1_269140	1.0619	transport protein particle component, Bet3 domain-containing prote
TGGT1_262920	1.72399	trypsin domain-containing protein	TGGT1_254660	1.06078	ankyrin repeat-containing protein
TGGT1_218840	1.70831	mutS domain protein	TGGT1_292130	1.05679	ribosomal protein RPL13A
TGGT1_278160	1.69267	vesicle transport v-snare protein	TGGT1_214920	1.05581	putative GPI-anchored wall transfer protein GWT1
TGGT1_259230	1.68384	site-specific recombinase, phage integrase family protein	TGGT1_297800	1.04828	RecF/RecN/SMC N terminal domain-containing protein
TGGT1_215100	1.67789	PP-loop family protein	TGGT1_299070	1.04451	pyruvate kinase PykII
TGGT1_261070	1.67376	apicoplast triosephosphate translocator APT1	TGGT1_226870A	1.04339	tubulin gamma chain
TGGT1_289070	1.63973	E1-E2 ATPase subfamily protein	TGGT1_288700	1.04185	RecF/RecN/SMC N terminal domain-containing protein
TGGT1_208730	1.63337	putative microneme protein	TGGT1_299150	1.03322	AP2 domain transcription factor AP2III-3
TGGT1_290970	1.61061	8-amino-7-oxononanoate synthase	TGGT1_249270	1.02997	putative protein disulfide isomerase-related protein (provisional)
TGGT1_256920	1.60116	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-Kinase	TGGT1_214350	1.0244	putative GTP-binding protein
TGGT1_211040	1.58189	Sec61beta family protein	TGGT1_215990	1.02288	putative helicase
TGGT1_209650B	1.56181	RNA-directed DNA polymerase	TGGT1_248370	1.01478	putative prefolin subunit 6
TGGT1_275568	1.55739	GPI transamidase subunit PIG-U protein	TGGT1_233680	1.01457	nuclear movement family protein
TGGT1_232450	1.55563	SWI2/SNF2-containing protein RAD54	TGGT1_203710	1.00973	AP2 domain transcription factor AP2VIIa-4
TGGT1_267390	1.54113	DNA-directed RNA polymerase I RPAC1	TGGT1_202490	1.00785	AP2 domain transcription factor AP2VIIa-7
TGGT1_260270	1.53519	HEAT repeat-containing protein	TGGT1_224235	1.00634	translation initiation factor IF-3 protein
TGGT1_270840	1.51258	poly(ADP-ribose) polymerase catalytic domain-containing protein	TGGT1_238240	1.00593	bystin protein
TGGT1_283450	1.51091	Toxoplasma gondii family B protein	TGGT1_229370	1.00579	AP2 domain transcription factor AP2VIII-1
TGGT1_300120	1.50936	aminotransferase, class V superfamily protein	TGGT1_239600	1.00389	thopyr kinase family protein ROP23 (incomplete catalytic triad)

**ANEXO 22.** DEGs asociados a la ruta del metabolismo de piruvato sobre expresados en *T. gondii* entre la primera y la sexta hora al interactuar con PBMCs-h negativos.

Gene ID	Transcript ID	Gene Group (representative gene)	Organism	Genomic Location (Gene)	Product Description	Gene Type	Input ID
TGGT1_206610	TGGT1_206610-t26_1	TGGT1_206610-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	TGGT1_chrVIIa:755,999..763,930(-)	pyruvate dehydrogenase complex subunit PDHE2	protein coding	TGGT1_206610
TGGT1_221320	TGGT1_221320-t26_1	TGGT1_221320-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	TGGT1_chrIII:218,988..235,059(-)	acetyl-CoA carboxylase ACC1	protein coding	TGGT1_221320
TGGT1_245670	TGGT1_245670-t26_1	TGGT1_245670-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	TGGT1_chrXII:2,396,583..2,400,897(+)	pyruvate dehydrogenase complex subunit PDHE1Alpha	protein coding	TGGT1_245670
TGGT1_264000	TGGT1_264000-t26_1	TGGT1_264000-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	TGGT1_chrVIIb:213,798..224,025(-)	aldehyde dehydrogenase	protein coding	TGGT1_264000
TGGT1_299070	TGGT1_299070-t26_1	TGGT1_299070-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	TGGT1_chrIII:2,188,027..2,191,756(+)	pyruvate kinase PyKII	protein coding	TGGT1_299070
TGGT1_305980	TGGT1_305980-t26_1	TGGT1_305980-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	TGGT1_chrIX:5,486,775..5,490,424(+)	pyruvate dehydrogenase complex subunit PDHE3I	protein coding	TGGT1_305980
TGGT1_318430	TGGT1_318430-t26_1	TGGT1_318430-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	TGGT1_chrIV:1,282,502..1,286,316(+)	malate dehydrogenase MDH	protein coding	TGGT1_318430

**ANEXO 23.** DEGs sobre expresados en *T. gondii* entre la primera y la sexta hora al interactuar con PBMCs-h negativos, asociados al proceso de replicación de ADN.

Gene ID	Transcript ID	Gene Group (representative gene)	Organism	Genomic Location (Gene)	Product Description	Gene Type	Input ID
TGGT1_237110	TGGT1_237110-t26_1	TGGT1_237110-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	TGGT1_chrX:5,615,960..5,623,389(+)	putative replication factor C subunit 2	protein coding	TGGT1_237110
TGGT1_243920	TGGT1_243920-t26_1	TGGT1_243920-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	TGGT1_chrVI:2,796,800..2,806,044(+)	putative DNA replication licensing factor MCM5	protein coding	TGGT1_243920
TGGT1_260680	TGGT1_260680-t26_1	TGGT1_260680-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	TGGT1_chrVIIb:2,034,580..2,042,093(+)	putative small subunit DNA primase	protein coding	TGGT1_260680
TGGT1_268600	TGGT1_268600-t26_1	TGGT1_268600-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	TGGT1_chrVIII:6,399,100..6,403,068(+)	DNA polymerase epsilon subunit B protein	protein coding	TGGT1_268600
TGGT1_272900	TGGT1_272900-t26_1	TGGT1_272900-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	TGGT1_chrVIII:3,716,460..3,719,359(-)	putative DNA repair protein RAD51	protein coding	TGGT1_272900
TGGT1_280690	TGGT1_280690-t26_1	TGGT1_280690-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	TGGT1_chrVIIIa:157,867..165,977(+)	DNA polymerase epsilon subunit B protein	protein coding	TGGT1_280690
TGGT1_294640	TGGT1_294640-t26_1	TGGT1_294640-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	TGGT1_chrIa:1,013,691..1,019,168(+)	ribonucleoside-diphosphate reductase large chain	protein coding	TGGT1_294640
TGGT1_319860	TGGT1_319860-t26_1	TGGT1_319860-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	TGGT1_chrIV:664,465..687,205(-)	DNA polymerase family B protein	protein coding	TGGT1_319860

## ANEXO 24. DEGs de *T. gondii* expresados a la baja en la interacción con PBMCs-h negativos en la primera y la sexta hora.

88 DEGs de <i>T.gondii</i> DOWN en NEG 1 vs 6hpi					
gene	log2(fold_change)	Product Description	gene	log2(fold_change)	Product Description
TGGT1_314250	-4.31489	bradyzoite rhoptry protein BRP1	TGGT1_258700	-1.99984	transporter, major facilitator family protein
TGGT1_252200	-3.87722	cell cycle regulator with zn-finger domain-containing protein	TGGT1_318470	-1.99809	AP2 domain transcription factor AP2IV-4
TGGT1_356400	-3.61437	cAMP-dependent protein kinase	TGGT1_286590	-1.97698	microtubule associated protein SPM2
TGGT1_299060	-3.56498	sodium/hydrogen exchanger NHE2	TGGT1_268870	-1.92289	tetratricopeptide repeat-containing protein
TGGT1_297960B	-3.42818	rhoptry neck protein RON6	TGGT1_201630B	-1.88769	protein phosphatase 2C domain-containing protein
TGGT1_215775	-3.28289	rhoptry protein ROP8	TGGT1_316280	-1.80467	transporter, major facilitator family protein
TGGT1_410600	-3.21945	putative cAMP-dependent protein kinase	TGGT1_231630	-1.78249	alveolin domain containing intermediate filament IMC4
TGGT1_411430	-3.07152	rhoptry protein ROP5	TGGT1_312100	-1.64065	plasma membrane-type Ca(2+)-ATPase A1 PMCA1
TGGT1_209985	-3.03226	cAMP-dependent protein kinase	TGGT1_236050	-1.63457	putative fructose-bisphosphate aldolase
TGGT1_280480	-2.97013	EF hand domain-containing protein	TGGT1_202390	-1.59259	S15 sporozoite-expressed protein
TGGT1_295125	-2.90277	rhoptry protein ROP4	TGGT1_310010	-1.59212	rhoptry neck protein RON1
TGGT1_224880	-2.81968	kinesin motor domain-containing protein	TGGT1_315220	-1.55357	rhoptry protein ROP14
TGGT1_202500	-2.81371	GAPM1a	TGGT1_311470	-1.54848	rhoptry neck protein RONS
TGGT1_269885A	-2.73844	rhoptry metalloprotease toxolysin TLN1	TGGT1_211290	-1.52918	rhoptry protein ROP15
TGGT1_308810A	-2.73377	rhoptry neck protein RON9	TGGT1_319600	-1.49255	putative alpha-tubulin N-acetyltransferase
TGGT1_231640	-2.73447	alveolin domain containing intermediate filament IMC1	TGGT1_306450	-1.48493	putative short chain dehydrogenase family protein
TGGT1_308810B	-2.72607	rhoptry neck protein RON9	TGGT1_215895	-1.46986	AP2 domain-containing protein
TGGT1_214080	-2.7027	toxofilin	TGGT1_230210	-1.45689	alveolin domain containing intermediate filament IMC10
TGGT1_223920	-2.65744	rhoptry neck protein RON3	TGGT1_227810	-1.4488	rhoptry kinase family protein ROP11 (incomplete catalytic triad)
TGGT1_216000	-2.63786	alveolin domain containing intermediate filament IMC3	TGGT1_277220	-1.36461	GDA1/CD39 (nucleoside phosphatase) family protein
TGGT1_291960	-2.6278	rhoptry kinase family protein ROP40 (incomplete catalytic triad)	TGGT1_305590	-1.34117	ABC transporter transmembrane region domain-containing protein
TGGT1_410590	-2.56513	cAMP-dependent protein kinase	TGGT1_237800	-1.26822	dense granule protein GRA11
TGGT1_220270	-2.55724	alveolin domain containing intermediate filament IMC6	TGGT1_202580	-1.26645	ATPase, AAA family protein
TGGT1_265080	-2.54512	Tubulin-tyrosine ligase family protein	TGGT1_288950	-1.23877	AP2 domain transcription factor AP2IX-4
TGGT1_300100	-2.54304	rhoptry neck protein RON2	TGGT1_294330	-1.21456	EGF family domain-containing protein
TGGT1_411410	-2.53964	putative transmembrane protein	TGGT1_285870	-1.20247	SAG-related sequence SRS20A
TGGT1_297960A	-2.53929	rhoptry neck protein RON6	TGGT1_233030	-1.19704	gliding-associated protein GAP70
TGGT1_295110	-2.4704	rhoptry protein ROP7	TGGT1_203390	-1.15538	CRAL/TRIO domain-containing protein
TGGT1_219348	-2.41391	SAG-related sequence SRS55M	TGGT1_221620	-1.14049	putative beta-tubulin
TGGT1_309590	-2.33585	rhoptry protein ROP1	TGGT1_204130	-1.12249	perforin-like protein PLP1
TGGT1_203990	-2.33088	rhoptry protein ROP12	TGGT1_236860	-1.11467	haloacid dehalogenase family hydrolase domain-containing protein
TGGT1_315210	-2.29191	putative rhoptry protein	TGGT1_271625A	-1.10538	serine-tRNA ligase
TGGT1_226220	-2.26501	alveolin domain containing intermediate filament IMC9	TGGT1_264485	-1.09832	AP2 domain transcription factor AP2IX-3
TGGT1_294610	-2.26399	putative histone lysine methyltransferase, SET	TGGT1_356120	-1.07237	putative kelch repeat protein
TGGT1_269885B	-2.2442	rhoptry metalloprotease toxolysin TLN1	TGGT1_246550	-1.04717	aspartyl protease ASP3
TGGT1_275670	-2.23003	alveolin domain containing intermediate filament IMC15	TGGT1_202820	-1.04534	ubiquitin-conjugating enzyme subfamily protein
TGGT1_306060	-2.2028	rhoptry neck protein RON8	TGGT1_245490	-1.04413	microneme protein MIC8
TGGT1_308090	-2.18726	rhoptry protein ROP5	TGGT1_282055	-1.03141	protein phosphatase PP2C-hn
TGGT1_304670	-2.18241	leucine rich repeat-containing protein	TGGT1_205520	-1.02886	rhoptry protein ROP18
TGGT1_239830	-2.14705	TBC domain-containing protein	TGGT1_357130	-1.02656	WD domain, G-beta repeat protein
TGGT1_258660	-2.13274	rhoptry protein ROP6	TGGT1_251740	-1.02445	AP2 domain transcription factor AP2XII-9
TGGT1_263520	-2.0291	microtubule associated protein SPM1	TGGT1_249030	-1.02288	endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein
TGGT1_220420	-2.0222	3'-5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase domain-containing protein	TGGT1_233300	-1.01557	RhoGAP domain-containing protein
TGGT1_363030	-2.01494	rhoptry protein ROP8			
TGGT1_258550	-2.00846	SAG-related sequence SRS28			

## ANEXO 25. DEGs a la baja en *T. gondii* entre la primera y la sexta hora al interactuar con PBMCs-h negativos, mostrando los 21 DEGs provenientes del complejo apical.

Gene ID	Transcript ID	Organism	Product Description	Gene Type
TGGT1_203990	TGGT1_203990-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	rhoptry protein ROP12	protein coding
TGGT1_204130	TGGT1_204130-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	perforin-like protein PLP1	protein coding
TGGT1_205250	TGGT1_205250-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	rhoptry protein ROP18	protein coding
TGGT1_211290	TGGT1_211290-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	rhoptry protein ROP15	protein coding
TGGT1_214080	TGGT1_214080-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	toxofilin	protein coding
TGGT1_215775	TGGT1_215775-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	rhoptry protein ROP8	protein coding
TGGT1_223920	TGGT1_223920-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	rhoptry neck protein RON3	protein coding
TGGT1_227810	TGGT1_227810-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	rhoptry kinase family protein ROP11 (incomplete catalytic triad)	protein coding
TGGT1_231630	TGGT1_231630-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	alveolin domain containing intermediate filament IMC4	protein coding
TGGT1_245490	TGGT1_245490-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	microneme protein MIC8	protein coding
TGGT1_282055	TGGT1_282055-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	protein phosphatase PP2C-hn	protein coding
TGGT1_297960A	TGGT1_297960A-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	rhoptry neck protein RON6	protein coding
TGGT1_297960B	TGGT1_297960B-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	rhoptry neck protein RON6	protein coding
TGGT1_299060	TGGT1_299060-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	sodium/hydrogen exchanger NHE2	protein coding
TGGT1_300100	TGGT1_300100-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	rhoptry neck protein RON2	protein coding
TGGT1_306060	TGGT1_306060-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	rhoptry neck protein RON8	protein coding
TGGT1_308090	TGGT1_308090-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	rhoptry protein ROP5	protein coding
TGGT1_309590	TGGT1_309590-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	rhoptry protein ROP1	protein coding
TGGT1_310010	TGGT1_310010-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	rhoptry neck protein RON1	protein coding
TGGT1_311470	TGGT1_311470-t26_1	<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	rhoptry neck protein RONS	protein coding

## ANEXO 26. DEGs sobre expresados en *T.gondii* entre la 0 y 6 hpi en NEG.

292 DEGs sobre expresados en <i>T.gondii</i> entre la 0 horas y la sexta hora de intacción con PBMCs-h negativos					
gene	log2(fold_change)	Product Description	gene	log2(fold_change)	Product Description
TGGT1_360840	inf	SAG-related sequence protein SRS48E	TGGT1_321660	1.35663	putative mannosyltransferase
TGGT1_254140	inf	DNA-directed RNA polymerase II RP ABC4	TGGT1_264650	1.36496	phosphoacetylglucosamine mutase
TGGT1_320770	inf	Toxoplasma gondii family 8 protein	TGGT1_262920	1.3646	trypsin domain-containing protein
TGGT1_305220	inf	c-Myc-binding family protein	TGGT1_215420	1.35432	
TGGT1_251870	inf	histone H2bb	TGGT1_222150	1.35366	
TGGT1_253330	3.85106	Rhoptry kinase family protein	TGGT1_238230	1.35115	Ser/Thr phosphatase family protein
TGGT1_266610	3.65031	Kazal-type serine protease inhibitor domain-containing protein	TGGT1_265010	1.34419	glutamate 5-kinase domain-containing protein
TGGT1_207150	3.4898	SAG-related sequence SRS49C	TGGT1_211260	1.33922	rhoptry kinase family protein ROP26 (incomplete catalytic triad)
TGGT1_278080	3.48862	Toxoplasma gondii family A protein	TGGT1_266730	1.33521	leucyl-tRNA synthetase (LeuRS2)
TGGT1_252640	3.47617	P-type ATPase PMA1	TGGT1_230520	1.33273	putative cyclophilin 1
TGGT1_264660	3.37579	SAG-related sequence SRS44	TGGT1_246920	1.33119	glutathione reductase
TGGT1_290970	3.34852	8-amino-7-oxononanoate synthase	TGGT1_242020	1.33035	mannosyl-oligosaccharide glucosidase
TGGT1_411550	3.30744	toxoplasma gondii family A protein	TGGT1_225420	1.32959	histidine triad domain-containing protein
TGGT1_207160	3.29741	SAG-related sequence SRS49D	TGGT1_246630	1.31776	DNA-directed RNA polymerase I RPA43
TGGT1_280580	3.02777	SAG-related sequence SRS35B	TGGT1_320690	1.31535	putative gamma-soluble NSF attachment protein
TGGT1_225290	2.92095	GDA1/CD39 (nucleoside phosphatase) family protein	TGGT1_285850	1.31394	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FKBP-type domain-containing protein
TGGT1_217740	2.87548	3-ketoacyl-acyl-carrier-protein) reductase	TGGT1_318750	1.3118	deoxyribose-phosphate aldolase
TGGT1_278390	2.77231	Toxoplasma gondii family A protein	TGGT1_267130	1.30696	SAG-related sequence SRS38A
TGGT1_270240	2.77117	MAG1 protein	TGGT1_242340	1.30433	ribosomal protein RPS29
TGGT1_267150	2.74664	SAG-related sequence SRS38C	TGGT1_267380	1.29976	UDP-galactose transporter subfamily protein
TGGT1_266340	2.72417	Toxoplasma gondii family A protein	TGGT1_249180	1.28534	bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase
TGGT1_272440	2.69113	RNA recognition motif-containing protein	TGGT1_206610	1.28504	pyruvate dehydrogenase complex subunit PDH-E2
TGGT1_245670	2.66534	pyruvate dehydrogenase complex subunit PDH-E1Alpha	TGGT1_249720	1.28283	putative ATP synthase F0 subunit 9
TGGT1_261070	2.66476	apicoplast triosephosphate translocator APT1	TGGT1_202370	1.27927	putative T-complex protein 1, epsilon subunit (TCP-1-epsilon)
TGGT1_224170	2.60664	SAG-related sequence SRS60A	TGGT1_318675	1.27657	3'-5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase domain-containing protein
TGGT1_263380	2.59808	Dullard family phosphatase domain-containing protein	TGGT1_213520	1.27118	peptidase M20D, amidohydrolase
TGGT1_305980	2.55931	pyruvate dehydrogenase complex subunit PDH-E3I	TGGT1_278740	1.26925	diaminopimelate decarboxylase
TGGT1_249150	2.50534	PAN domain-containing protein	TGGT1_214580	1.26828	tetratricopeptide repeat-containing protein
TGGT1_221310	2.47382	aminopeptidase N protein	TGGT1_222140	1.26555	DEAD/DEAH box helicase domain-containing protein
TGGT1_222370	2.4073	SAG-related sequence SRS13	TGGT1_246800	1.26471	putative acylaminoacyl-peptidase
TGGT1_316700	2.38416	uridine kinase	TGGT1_257490	1.26414	profilin subunit superfamily protein
TGGT1_239600	2.383	rhoptry kinase family protein ROP23 (incomplete catalytic triad)	TGGT1_253420	1.26312	PQ loop repeat-containing protein
TGGT1_264080	2.35234	acyl carrier protein ACP	TGGT1_273730	1.26203	phospholipase, patatin family protein
TGGT1_233065	2.32331	3'-5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase domain-containing protein	TGGT1_214350	1.26117	putative GTP-binding protein
TGGT1_278280	2.32229	Toxoplasma gondii family A protein	TGGT1_311390	1.26073	tRNA (guanine)-[N1]methyltransferase
TGGT1_280570	2.28721	SAG-related sequence SRS35A	TGGT1_266620	1.2579	thioredoxin domain-containing protein
TGGT1_243190	2.26835	Toxoplasma gondii family A protein	TGGT1_312480	1.25328	putative uracil phosphoribosyltransferase FUR1
TGGT1_286630	2.26674	redoxin domain-containing protein	TGGT1_238950	1.2528	putative fatty acyl-CoA desaturase
TGGT1_207140	2.2606	SAG-related sequence SRS49B	TGGT1_237560	1.25187	iron-sulfur cluster protein ISCU
TGGT1_278370	2.24315	Toxoplasma gondii family A protein	TGGT1_319550	1.24961	putative membrane protein C17G8.08c
TGGT1_410900	2.23564	toxoplasma gondii family A protein	TGGT1_315250	1.24956	putative GAMM1 protein
TGGT1_301210	2.1746	putative NAD(P) transhydrogenase subunit beta	TGGT1_215680	1.2494	SAG-related sequence SRS18
TGGT1_319360	2.15573	SAG-related sequence SRS17A	TGGT1_297840	1.24624	DNA primase, large subunit
TGGT1_208730	2.15554	putative microneme protein	TGGT1_320600	1.24381	cold-shock DNA-binding domain-containing protein
TGGT1_244510	2.14828	AP2 domain transcription factor AP2V1-3	TGGT1_202900	1.24305	zinc finger (CCCH type) motif-containing protein
TGGT1_274170	2.14552	protein kinase (incomplete catalytic triad)	TGGT1_259530	1.24145	GalNac
TGGT1_251930	2.11819	enoyl-acyl carrier reductase ENR	TGGT1_240430	1.23917	glyoxalase family protein
TGGT1_240930	2.07212	MoA family protein	TGGT1_224610	1.23654	GYF domain-containing protein
TGGT1_208560	2.06959	carrier superfamily protein	TGGT1_295730	1.22684	tetratricopeptide repeat-containing protein
TGGT1_203700	2.04414	SFT2 family protein	TGGT1_265220	1.22682	co-chaperone GrpE protein
TGGT1_315885	2.03973	putative glycosyltransferase	TGGT1_257960	1.22658	GDP-D-mannose pyrophosphorylase
TGGT1_233040	2.02323	3'-5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase domain-containing protein	TGGT1_290005	1.2222	putative proteasome subunit beta type 1
TGGT1_208740	1.99499	putative microneme protein	TGGT1_300130	1.22194	apical membrane antigen 1 domain-containing protein
TGGT1_320190	1.99487	SAG-related sequence SRS16B	TGGT1_223125	1.22184	ubiquitin family protein
TGGT1_252210	1.92534	pentatricopeptide repeat domain-containing protein	TGGT1_231890	1.22097	putative beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III
TGGT1_259920	1.92273	Nitric-oxide synthase	TGGT1_210408	1.22068	HMG (high mobility group) box domain-containing protein
TGGT1_286150	1.92035	PAN/Apple domain-containing protein	TGGT1_246690	1.21894	alpha amylase, catalytic domain-containing protein
TGGT1_243510	1.91647	OTU family cysteine protease	TGGT1_291930	1.21784	RNA recognition motif-containing protein
TGGT1_220450	1.90733	ribonuclease HI protein	TGGT1_237110	1.21266	putative replication factor C subunit 2
TGGT1_218810	1.89214	histidyl-tRNA synthetase	TGGT1_218530	1.21128	proteasome-interacting thioredoxin domain-containing protein
TGGT1_301160	1.8908	SAG-related sequence SRS19C	TGGT1_239320	1.21073	BoIa family protein
TGGT1_231400A	1.88609	tubulin/Fts2 family, GTPase domain-containing protein	TGGT1_262050	1.21017	rhoptry kinase family protein ROP39
TGGT1_301180	1.88161	SAG-related sequence SRS19F	TGGT1_275568	1.20861	GPI transamidase subunit PiG-U protein
TGGT1_224235	1.86688	translation initiation factor IF-3 protein	TGGT1_293810	1.20616	carboxyvinyl-carboxyphosphonate phosphorylmutase
TGGT1_218540	1.85722	putative peptidase S15	TGGT1_240840	1.20518	histone lysine demethylase jimC NO66
TGGT1_272900	1.85339	putative DNA repair protein RAD51	TGGT1_239500	1.19971	putative proteasome subunit alpha type
TGGT1_293510	1.8364	poly(ADP-ribose) polymerase and DNA-Ligase Zn-finger region domain-containing protein	TGGT1_209800	1.19841	formate/nitrite transporter protein
TGGT1_295015	1.82193	patched family protein	TGGT1_312380	1.19688	tetratricopeptide repeat-containing protein
TGGT1_270840	1.80663	poly(ADP-ribose) polymerase catalytic domain-containing protein	TGGT1_321480	1.19461	SAG-related sequence SRS12B
TGGT1_300120	1.79925	aminotransferase, class V superfamily protein	TGGT1_278660	1.18936	putative P-type ATPase4
TGGT1_250880	1.79533	kinase, pifB family protein	TGGT1_249560	1.17635	DNA-directed RNA polymerase alpha chain rpoA
TGGT1_299070	1.78531	pyruvate kinase PykII	TGGT1_289070	1.17043	E1-E2 ATPase subfamily protein

## CONTINUACIÓN DEL ANEXO 26.

gene	log2(fold_change)	Product Description	gene	log2(fold_change)	Product Description
TGGT1_238200	1.77991	alpha/beta hydrolase fold domain-containing protein	TGGT1_264780	1.16878	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase subfamily protein
TGGT1_23998	1.77415	zinc finger (CCCH type) motif-containing protein	TGGT1_218920	1.16697	putative proteasome subunit beta type
TGGT1_222020	1.76954	phosphoglycerate kinase PCKII	TGGT1_257730	1.16205	putative methionine aminopeptidase, type1
TGGT1_269550	1.764	dihydroxyacetate synthase	TGGT1_288600	1.15867	WD domain, G-beta repeat-containing protein
TGGT1_291670	1.75664	DEAD/DEAH box helicase domain-containing protein	TGGT1_278240	1.15599	Zn-finger in Ran binding protein and others domain-containing protein
TGGT1_255370	1.73321	TIC20 protein	TGGT1_316530	1.15347	putative myosin heavy chain
TGGT1_221830	1.7325	subtilisin SUB12	TGGT1_250760	1.14809	pentatricopeptide repeat domain-containing protein
TGGT1_266270	1.72715	short-chain-acyl-CoA dehydrogenase	TGGT1_219130	1.14706	NADPH-glucose oxidase
TGGT1_227430	1.72397	transmembrane amino acid transporter protein	TGGT1_243480	1.14522	putative S05 ribosomal protein L3
TGGT1_225990	1.70298	acyl transferase domain-containing protein	TGGT1_222160	1.14467	aldehyde dehydrogenase
TGGT1_231170	1.68796	RecF/RecN/SMC N terminal domain-containing protein	TGGT1_294420	1.14298	programmed cell death protein 2, c-terminal domain-containing protein
TGGT1_205410	1.6629	RNA pseudouridine synthase superfamily protein	TGGT1_292920	1.1342	putative heat shock protein 75
TGGT1_270650	1.65437	deoxyribose-phosphate aldolase	TGGT1_249200	1.1325	Ctr copper transporter family protein
TGGT1_236570	1.65293	lysine decarboxylase family protein	TGGT1_249270	1.13113	putative protein disulfide isomerase-related protein (provisional)
TGGT1_240830	1.64483	hydrolase, alpha/beta fold family protein	TGGT1_307650	1.13036	uracil-DNA glycosylase
TGGT1_209060	1.64185	thrombospondin type 1 domain-containing protein	TGGT1_281510	1.12623	putative ribonuclease H1 large subunit
TGGT1_246070	1.62436	SAG-related sequence SR556	TGGT1_226700	1.12512	putative nuclease
TGGT1_226800	1.62319	eukaryotic glutathione synthase, atp binding domain-containing protein	TGGT1_280740	1.12397	signal peptidase
TGGT1_237890	1.62265	calcium-dependent protein kinase CDPK4	TGGT1_241880	1.12394	3'5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase domain-containing protein
TGGT1_272430	1.62013	MAC/Perforin domain-containing protein	TGGT1_309590	1.12199	tetratricopeptide repeat-containing protein
TGGT1_266760	1.61901	isocitrate dehydrogenase	TGGT1_249740	1.11615	translation machinery associated tma7 protein
TGGT1_266860	1.5973	BTB/POZ domain-containing protein	TGGT1_246030	1.10813	mediator complex subunit MED17
TGGT1_202460	1.59541	diacylglycerol kinase accessory domain (presumed) domain-containing protein	TGGT1_258800	1.10378	rhoxy kinase family protein ROP31
TGGT1_310850	1.59488	MYND finger domain-containing protein	TGGT1_259200B	1.09992	Na/H exchanger NHE1
TGGT1_285700	1.58928	ubiquitin fusion degradation protein UFD1AP	TGGT1_306480	1.09772	CAM kinase, CDPK family
TGGT1_254900	1.58858	putative proteasome subunit beta type 2	TGGT1_225880	1.09045	UDP-glucose 4-epimerase
TGGT1_257740	1.5882	UMP-CMP kinase	TGGT1_215450	1.09007	aquaporin 1
TGGT1_210830	1.58538	RII1 family protein	TGGT1_216250	1.08854	RecF/RecN/SMC N terminal domain-containing protein
TGGT1_239530	1.57683	alanine-glyoxylate aminotransferase	TGGT1_318610	1.08743	AP2 domain transcription factor AP2IV-3
TGGT1_318730	1.57306	glycosyl transferase	TGGT1_226430	1.08535	reticulon protein
TGGT1_309930	1.56714	methylase subfamily protein	TGGT1_221320	1.08388	acetyl-CoA carboxylase ACC1
TGGT1_274070	1.56666	Thif family protein	TGGT1_262760	1.07987	poly(ADP-ribose) glycohydrolase
TGGT1_267390	1.56439	DNA-directed RNA polymerase I RPA1	TGGT1_260420	1.07901	HEC/Ndc80p family protein
TGGT1_226990	1.56402	DEAD/DEAH box helicase domain-containing protein	TGGT1_307350	1.07873	Toxoplasma gondii family C protein
TGGT1_216140	1.56449	tetratricopeptide repeat-containing protein	TGGT1_233350	1.076	putative nuclear transport factor 2
TGGT1_265830	1.54607	phosphodiesterase/alkaline phosphatase D family protein	TGGT1_253780	1.07383	putative GTP cyclohydrolase I
TGGT1_321470	1.54519	SAG-related sequence SR512D	TGGT1_237425	1.07244	AP2 domain transcription factor AP2X-6
TGGT1_235880	1.53856	brain protein 44 family protein	TGGT1_311660	1.07059	putative histone lysine methyltransferase, SET
TGGT1_283450	1.53506	Toxoplasma gondii family B protein	TGGT1_254520	1.07018	mediator complex subunit MED11
TGGT1_286720	1.53144	heat shock protein HSP28	TGGT1_226480	1.0686	DNA topoisomerase family protein
TGGT1_238210	1.52423	EGF family domain-containing protein	TGGT1_306320	1.0663	Myb family DNA-binding domain-containing protein
TGGT1_232580	1.52212	propionate-CoA ligase	TGGT1_283710	1.0647	longevity-assurance protein (LAG1) domain-containing protein
TGGT1_315740	1.51998	SAG-related sequence SR554	TGGT1_227280	1.06356	dense granule protein GRA3
TGGT1_294250	1.51871	WD domain, G-beta repeat-containing protein	TGGT1_238100	1.06285	transmembrane protein
TGGT1_263470	1.51745	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase UCHL3	TGGT1_249020	1.06283	kinesin motor domain-containing protein
TGGT1_318430	1.51265	malate dehydrogenase MDH	TGGT1_254660	1.06258	ankyrin repeat-containing protein
TGGT1_246100	1.51083	putative phosphodiesterase	TGGT1_260680	1.06213	putative small subunit DNA primase
TGGT1_320180	1.49491	SAG-related sequence SR516C	TGGT1_239310	1.0611	ribose 5-phosphate isomerase
TGGT1_262910	1.49037	putative NADH-cytochrome b5 reductase 1	TGGT1_229140	1.05164	MacC family domain-containing protein
TGGT1_307850	1.48046	6-phosphogluconate dehydrogenase	TGGT1_263430	1.05038	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase
TGGT1_279450	1.47317	putative adenylosuccinate synthetase	TGGT1_227970	1.04825	histone family DNA-binding protein
TGGT1_244450	1.46796	protein phosphatase 2C domain-containing protein	TGGT1_252850	1.04681	initiation factor, subunit 2 family protein
TGGT1_260030	1.46608	atypical MEK-related kinase (incomplete catalytic triad)	TGGT1_248850	1.04507	methionine aminopeptidase
TGGT1_269300	1.46359	lipase	TGGT1_244180	1.04476	microneme-like protein
TGGT1_209140	1.45949	anti-silencing protein, ASF1 family protein	TGGT1_278230	1.0447	prenyltransferase and squalene oxidase repeat-containing protein
TGGT1_272570	1.45501	dihydrouridine synthase (dus) protein	TGGT1_258380	1.04462	elongation factor (eIF) kow family domain-containing protein
TGGT1_212970	1.43894	protein kinase (incomplete catalytic triad)	TGGT1_311650	1.0398	leucine rich repeat-containing protein
TGGT1_289350	1.43432	ATP-binding cassette G family transporter ABCG84	TGGT1_230020	1.03799	transporter, major facilitator family protein
TGGT1_233680	1.43216	nuclear movement family protein	TGGT1_247790	1.03415	VRR-NUC domain-containing protein
TGGT1_306338B	1.43143	putative dynein gamma chain, flagellar outer arm	TGGT1_232520	1.03257	bris domain-containing protein
TGGT1_297080	1.43017	pyridoxal kinase	TGGT1_249920	1.03242	putative diphthine synthase
TGGT1_278110	1.42446	1,3-beta-glucan synthase component protein	TGGT1_220080	1.03078	Toxoplasma gondii family C protein
TGGT1_201840	1.42129	aspartyl protease ASP1	TGGT1_202510	1.02818	multi-pass transmembrane protein
TGGT1_226720	1.41606	transin family protein	TGGT1_311690	1.02458	UBA/TS-N domain-containing protein
TGGT1_316300	1.41569	ATP-dependent DNA helicase, RecQ family protein	TGGT1_305490	1.022	programmed cell death protein 2, c-terminal domain-containing protein
TGGT1_207630	1.40107	peptidyl-HRNA hydrolase domain-containing protein	TGGT1_295970, TGGT1_295	1.01674	
TGGT1_278120	1.39805	SCP family extracellular subfamily protein	TGGT1_247510	1.01488	fructose-bisphosphate II
TGGT1_275690	1.38861	putative ClpB	TGGT1_237140	1.01466	putative ethylene inducible protein
TGGT1_240600	1.38264	putative chaperonin cpn60	TGGT1_269140	1.013	transport protein particle component, Bet3 domain-containing protein
TGGT1_314730	1.38005	ALG6, ALG8 glycosyltransferase family protein	TGGT1_271200	1.01041	AP2 domain transcription factor AP2VIII-5
TGGT1_299110	1.3796	cleft lip and palate transmembrane protein 1 (clptm1) protein	TGGT1_259250	1.00966	ATP-dependent DNA helicase, RecQ family protein
TGGT1_289210	1.37279	prefoldin subunit protein	TGGT1_306330	1.00958	phospholipase
TGGT1_249702	1.36999	putative MC family transporter	TGGT1_225730	1.00939	putative membrane protein
TGGT1_267050	1.36935	hydrolase, alpha/beta fold family protein	TGGT1_225060	1.00769	nucleroxin family protein

**ANEXO 27.** Lista de DEGs putativos sobre expresados por *T. gondii* en la interacción con PBMCs-h negativos entre la primera y la sexta hpi.

<b>45 DEGS asociados a proteínas putativas en <i>T.gondii</i>, 0h vs 6h en NEG</b>		
gene	log2(fold_change)	Product Description
TGGT1_301210	2.1746	putative NAD(P) transhydrogenase subunit beta
TGGT1_208730	2.15554	putative microneme protein
TGGT1_315885	2.03973	putative glycosyltransferase
TGGT1_208740	1.99499	putative microneme protein
TGGT1_218540	1.85722	putative peptidase S15
TGGT1_272900	1.85339	putative DNA repair protein RAD51
TGGT1_254900	1.58858	putative proteasome subunit beta type 2
TGGT1_246100	1.51083	putative phosphatidylcholine transferase
TGGT1_262910	1.49037	putative NADH-cytochrome b5 reductase 1
TGGT1_279450	1.47317	putative adenylosuccinate synthetase
TGGT1_306338B	1.43143	putative dynein gamma chain, flagellar outer arm
TGGT1_275690	1.38361	putative ClpB
TGGT1_240600	1.38264	putative chaperonin cpn60
TGGT1_249702	1.36999	putative MC family transporter
TGGT1_321660	1.36663	putative mannosyltransferase
TGGT1_230520	1.33273	putative cyclophilin 1
TGGT1_320690	1.31535	putative gamma-soluble NSF attachment protein
TGGT1_249720	1.28283	putative ATP synthase F0 subunit 9
TGGT1_202370	1.27927	putative T-complex protein 1, epsilon subunit (TCP-1-epsilon)
TGGT1_246800	1.26471	putative acylaminoacyl-peptidase
TGGT1_214350	1.26117	putative GTP-binding protein
TGGT1_312480	1.25328	putative uracil phosphoribosyltransferase FUR1
TGGT1_238950	1.2528	putative fatty acyl-CoA desaturase
TGGT1_319550	1.24961	putative membrane protein C17G8.08c
TGGT1_315250	1.24956	putative GAMM1 protein
TGGT1_290005	1.2222	putative proteasome subunit beta type 1
TGGT1_231890	1.22097	putative beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III
TGGT1_237110	1.21266	putative replication factor C subunit 2
TGGT1_239500	1.19971	putative proteasome subunit alpha type
TGGT1_278660	1.18936	putative P-type ATPase4
TGGT1_218920	1.16697	putative proteasome subunit beta type
TGGT1_257730	1.16205	putative methionine aminopeptidase, type i
TGGT1_316530	1.15347	putative myosin heavy chain
TGGT1_243480	1.14522	putative 50S ribosomal protein L3
TGGT1_292920	1.1342	putative heat shock protein 75
TGGT1_249270	1.13113	putative protein disulfide isomerase-related protein (provisional)
TGGT1_281510	1.12623	putative ribonuclease H1 large subunit
TGGT1_226700	1.12512	putative nuclease
TGGT1_233350	1.076	putative nuclear transport factor 2
TGGT1_253780	1.07383	putative GTP cyclohydrolase I
TGGT1_311660	1.07059	putative histone lysine methyltransferase, SET
TGGT1_260680	1.06213	putative small subunit DNA primase
TGGT1_249920	1.03242	putative diphthine synthase
TGGT1_237140	1.01466	putative ethylene inducible protein
TGGT1_225730	1.00939	putative membrane protein

**ANEXO 28.** Lista de los principales grupos de moléculas asociadas a los DEGs sobre expresados en *T. gondii* al interactuar con PBMCs-h negativos entre la hora 0 y la hora 6.

Principales grupos de proteínas enriquecidos en <i>T.gondii</i> al interactuar con PBMCs-h negativos 0h vs 6 hpi			
	gene	log2(fold change)	Product Description
SRSs: SAG-related sequence proteins	TGGT1_360840	inf	SAG-related sequence protein SRS48E
	TGGT1_207150	3.4898	SAG-related sequence SRS49C
	TGGT1_264660	3.37579	SAG-related sequence SRS44
	TGGT1_207160	3.29741	SAG-related sequence SRS49D
	TGGT1_280580	3.02777	SAG-related sequence SRS35B
	TGGT1_267150	2.74664	SAG-related sequence SRS38C
	TGGT1_224170	2.60664	SAG-related sequence SRS60A
	TGGT1_222370	2.4073	SAG-related sequence SRS13
	TGGT1_280570	2.28721	SAG-related sequence SRS35A
	TGGT1_207140	2.2606	SAG-related sequence SRS49B
	TGGT1_319360	2.15573	SAG-related sequence SRS17A
	TGGT1_320190	1.99487	SAG-related sequence SRS16B
	TGGT1_301160	1.8908	SAG-related sequence SRS19C
	TGGT1_301180	1.88161	SAG-related sequence SRS19F
	TGGT1_246070	1.62436	SAG-related sequence SRS56
	TGGT1_321470	1.54519	SAG-related sequence SRS12D
	TGGT1_315740	1.51998	SAG-related sequence SRS54
	TGGT1_320180	1.49491	SAG-related sequence SRS16C
	TGGT1_267130	1.30696	SAG-related sequence SRS38A
	TGGT1_215680	1.2494	SAG-related sequence SRS18
TGGT1_321480	1.19461	SAG-related sequence SRS12B	
DNA related sequences	TGGT1_254140	inf	DNA-directed RNA polymerase II RPABC4
	TGGT1_272900	1.85339	putative DNA repair protein RAD51
	TGGT1_293510	1.8364	poly(ADP-ribose) polymerase and DNA-Ligase Zn-finger region domain-containing protein
	TGGT1_267390	1.56439	DNA-directed RNA polymerase I RPAC1
	TGGT1_316300	1.41569	ATP-dependent DNA helicase, RecQ family protein
	TGGT1_246630	1.31776	DNA-directed RNA polymerase I RPA43
	TGGT1_297840	1.24624	DNA primase, large subunit
	TGGT1_320600	1.24381	cold-shock DNA-binding domain-containing protein
	TGGT1_249560	1.17635	DNA-directed RNA polymerase alpha chain rpoA
	TGGT1_307650	1.13036	uracil-DNA glycosylase
	TGGT1_226480	1.0686	DNA topoisomerase family protein
	TGGT1_306320	1.0663	Myb family DNA-binding domain-containing protein
	TGGT1_260680	1.06213	putative small subunit DNA primase
	TGGT1_227970	1.04825	histone family DNA-binding protein
TGGT1_259250	1.00966	ATP-dependent DNA helicase, RecQ family protein	
Síntesis de Folato	TGGT1_240930	2.07212	MoaC family protein
	TGGT1_249180	1.28534	bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase
	TGGT1_249740	1.11615	translation machinery associated tma7 protein
	TGGT1_253780	1.07383	putative GTP cyclohydrolase I
	TGGT1_259550	1.764	dihydropterolate synthase
	TGGT1_265830	1.54607	phosphodiesterase/alkaline phosphatase D family protein
	TGGT1_306338E	1.43143	putative dynein gamma chain, flagellar outer arm
Proteínas ROPs	TGGT1_211260	1.33922	rhopty kinase family protein ROP26 (incomplete catalytic triad)
	TGGT1_239600	2.383	rhopty kinase family protein ROP23 (incomplete catalytic triad)
	TGGT1_262050	1.21017	rhopty kinase family protein ROP39
	TGGT1_258800	1.10378	rhopty kinase family protein ROP31

## ANEXO 29. Lista de los DEGs expresados a la baja en *T. gondii* entre la hora 0 y la hora 6 al interactuar con PBMCs-h negativos.

182 DEGs de <i>T.gondii</i> expresados a la baja en la interacción con PBMCs-h entre la hora 0 y la hora 6pi					
gene	log2(fold change)	Product Description	gene	log2(fold change)	Product Description
TGGT1_299060	-4.36195	sodium/hydrogen exchanger NHE2	TGGT1_287980	-1.40919	FHA domain-containing protein
TGGT1_297960B	-3.75836	rhopty neck protein RON6	TGGT1_277985	-1.40203	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase
TGGT1_252200	-3.64334	cell cycle regulator with zn-finger domain-containing protein	TGGT1_321450	-1.39801	Myb family DNA-binding domain-containing protein
TGGT1_318470	-3.28681	AP2 domain transcription factor AP2IV-4	TGGT1_224520	-1.38646	alveolin domain containing intermediate filament IMC8
TGGT1_201230	-3.19107	kinesin motor domain-containing protein	TGGT1_276180	-1.3775	histone acetyltransferase TAF1/250
TGGT1_275670	-3.17306	alveolin domain containing intermediate filament IMC15	TGGT1_288950	-1.36594	AP2 domain transcription factor AP2IX-4
TGGT1_265080	-3.14785	Tubulin-tyrosine ligase family protein	TGGT1_228160	-1.36102	acid phosphatase
TGGT1_232920	-3.12715	rhopty neck protein RON3	TGGT1_294610	-1.34935	putative histone lysine methyltransferase, SET
TGGT1_217700	-3.02414	AP2 domain transcription factor AP2XII-2	TGGT1_239420	-1.33079	protein kinase
TGGT1_248240	-3.02148	leucine rich repeat-containing protein	TGGT1_316680	-1.32384	RNA pseudouridine synthase superfamily protein
TGGT1_300100	-2.90683	rhopty neck protein RON2	TGGT1_357130	-1.30414	WD domain, G-beta repeat protein
TGGT1_226220	-2.89179	alveolin domain containing intermediate filament IMC9	TGGT1_294690	-1.30257	rhomoid protease ROM5
TGGT1_237210	-2.8182	Tyrosine kinase-like (TKL) protein	TGGT1_201120	-1.29783	ELMO/CE2-12 family protein
TGGT1_239830	-2.76494	TBC domain-containing protein	TGGT1_231070	-1.29553	protein kinase
TGGT1_316560	-2.75128	Toxoplasma gondii family D protein	TGGT1_215570	-1.29552	AP2 domain transcription factor AP2X-11
TGGT1_269460	-2.69596	Ser/Thr phosphatase family protein	TGGT1_234900	-1.28888	PHD-finger domain-containing protein
TGGT1_300230	-2.62547	putative nuclease	TGGT1_261300	-1.28787	protein kinase
TGGT1_300660	-2.58543	rhopty neck protein RON8	TGGT1_253030	-1.28192	glycosyl hydrolase, family 31 protein
TGGT1_269885A	-2.54327	rhopty metalloprotease toxolysin TLN1	TGGT1_291830	-1.27817	putative DNA double-strand break repair rad50 ATPase
TGGT1_258700	-2.53582	transporter, major facilitator family protein	TGGT1_202840	-1.27608	FHA domain-containing protein
TGGT1_314250	-2.5317	bradyzoite rhopty protein BRP1	TGGT1_232190	-1.27499	Sec7 domain-containing protein
TGGT1_202500	-2.50955	GAP44A	TGGT1_278510	-1.2729	protein phosphatase 2C domain-containing protein
TGGT1_291960	-2.50284	rhopty kinase family protein ROP40 (incomplete catalytic triad)	TGGT1_289490	-1.25986	serine/threonine specific protein phosphatase
TGGT1_295125	-2.46334	rhopty protein ROP4	TGGT1_255390	-1.24583	HEAT repeat-containing protein
TGGT1_236050	-2.42725	putative fructose-bisphosphate aldolase	TGGT1_272645	-1.23442	protein kinase
TGGT1_269885B	-2.42312	rhopty metalloprotease toxolysin TLN1	TGGT1_263000	-1.23382	Beige/BEACH domain-containing protein
TGGT1_304730	-2.3929	Mob1/hocein family protein	TGGT1_218720	-1.22595	calcium-dependent protein kinase CDPK6
TGGT1_308810B	-2.37081	rhopty neck protein RON9	TGGT1_291050	-1.22441	putative histone kinase SNF1
TGGT1_295110	-2.36059	rhopty protein ROP7	TGGT1_237280	-1.22092	TLD protein
TGGT1_246200	-2.33274	zinc finger (CCHC type) motif-containing protein	TGGT1_313570	-1.22027	regulator of chromosome condensation (RCC1) repeat-containing protein
TGGT1_224880	-2.31926	kinesin motor domain-containing protein	TGGT1_318350	-1.21545	Pumilio-family RNA binding repeat-containing protein
TGGT1_411430	-2.30985	rhopty protein ROP5	TGGT1_306450	-1.20538	putative short chain dehydrogenase family protein
TGGT1_308810A	-2.30977	rhopty neck protein RON9	TGGT1_263520	-1.20467	microtubule associated protein SPM1
TGGT1_315220	-2.27923	rhopty protein ROP14	TGGT1_263740	-1.20199	ABC transporter transmembrane region domain-containing protein
TGGT1_319600	-2.26879	putative alpha-tubulin N-acetyltransferase	TGGT1_272640	-1.19889	putative eukaryotic initiation factor-2B, epsilon subunit
TGGT1_213340	-2.24499	GNM oxidoreductase	TGGT1_277720	-1.19641	GDA1/CD39 (nucleoside phosphatase) family protein
TGGT1_268870	-2.24452	tetrairicopeptide repeat-containing protein	TGGT1_288640	-1.19467	radical SAM domain-containing protein
TGGT1_230150	-2.23593	ChSp-Arf1p-binding proteins) protein	TGGT1_272540	-1.19461	protein kinase (incomplete catalytic triad)
TGGT1_297950A	-2.20096	rhopty neck protein RON6	TGGT1_277740	-1.19385	zinc finger, C3HC4 type (RING finger) domain-containing protein
TGGT1_315210	-2.19578	putative rhopty protein	TGGT1_218580	-1.18558	RNA methyltransferase, TrmH family protein
TGGT1_311470	-2.17568	rhopty neck protein RON5	TGGT1_286932	-1.17635	ATPase family associated with various cellular activities (AAA) domain-containing protein
TGGT1_316280	-2.15338	transporter, major facilitator family protein	TGGT1_293260	-1.1755	ATPase/histidine kinase/DNA gyrase B/HSP90 domain-containing protein
TGGT1_305590	-2.09845	ABC transporter transmembrane region domain-containing protein	TGGT1_220230A	-1.16692	leucine rich repeat-containing protein
TGGT1_237090	-2.06529	AP2 domain transcription factor AP2X-5	TGGT1_281930	-1.15826	SAG-related sequence SR539
TGGT1_280770	-2.01518	regulator of chromosome condensation (RCC1) repeat-containing protein	TGGT1_272475	-1.13415	protein kinase domain-containing protein
TGGT1_229350	-2.00973	HEAT repeat-containing protein	TGGT1_221922	-1.13364	NifU family domain-containing protein
TGGT1_264420	-1.95074	putative lipoprotein	TGGT1_224480	-1.13223	putative cell-cycle-associated protein kinase CLK
TGGT1_308090	-1.93753	rhopty protein ROP5	TGGT1_240850	-1.12472	WD domain, G-beta repeat-containing protein
TGGT1_276130	-1.92584	cathepsin CPC2	TGGT1_215640	-1.12059	zinc finger, C3HC4 type (RING finger) domain-containing protein
TGGT1_216000	-1.92439	alveolin domain containing intermediate filament IMC3	TGGT1_203390	-1.11609	CRAL/TRIO domain-containing protein
TGGT1_238950	-1.91712	transporter, major facilitator family protein	TGGT1_257290	-1.1122	RNA 2'-phosphotransferase, Tpt1/KptA family protein
TGGT1_287160	-1.91139	internal kinesin motor domain protein	TGGT1_259950	-1.1117	carbonate dehydratase, eukaryotic-type domain-containing protein
TGGT1_201630B	-1.81531	protein phosphatase 2C domain-containing protein	TGGT1_223120	-1.1094	AP2 domain transcription factor AP2VIII-2
TGGT1_269180	-1.80924	MIF4G domain-containing protein	TGGT1_207940	-1.10915	putative ribosomal protein S9
TGGT1_204160	-1.80139	GVF domain-containing protein	TGGT1_253090	-1.10315	DEAD/DEAH box helicase domain-containing protein
TGGT1_203990	-1.78578	rhopty protein ROP12	TGGT1_253380	-1.10264	AP2 domain transcription factor AP2VII-2
TGGT1_285870	-1.78087	SAG-related sequence SR520A	TGGT1_304670	-1.10039	leucine rich repeat-containing protein
TGGT1_258660	-1.7598	rhopty protein ROP6	TGGT1_213392	-1.10016	surface antigen repeat-containing protein
TGGT1_200230	-1.75538	microneme protein MIC17C	TGGT1_218590	-1.09337	protein phosphatase 2C domain-containing protein
TGGT1_231640	-1.74295	alveolin domain containing intermediate filament IMC1	TGGT1_278930	-1.08706	Tubulin-tyrosine ligase family protein
TGGT1_286590	-1.73346	microtubule associated protein SPM2	TGGT1_209080	-1.08331	transport protein particle (trapp) component, bet3 protein
TGGT1_227370	-1.7321	hydrolase Coe/Nond family protein	TGGT1_312570	-1.08233	CMGC kinase, MAPK family (ERK) MAPK-1
TGGT1_215775	-1.72077	rhopty protein ROP8	TGGT1_309120	-1.08156	ribosomal protein RPL4
TGGT1_236860	-1.70732	haloacid dehalogenase family hydrolase domain-containing protein	TGGT1_254210	-1.0802	RNA recognition motif-containing protein
TGGT1_309590	-1.70724	rhopty protein ROP1	TGGT1_202390	-1.07879	S15 sporozite-expressed protein
TGGT1_257470	-1.67585	myosin J	TGGT1_213810	-1.0787	iron-sulfur cluster protein ISCA
TGGT1_248470	-1.66427	subtilisin SUB6	TGGT1_260150	-1.07813	tetratricopeptide repeat-containing protein
TGGT1_363030	-1.66422	rhopty protein ROP8B	TGGT1_221980	-1.06744	U1 zinc finger protein
TGGT1_292140	-1.65807	NIMA-related protein kinase NIMA1	TGGT1_204140	-1.06567	PHD-finger domain-containing protein
TGGT1_275610	-1.64886	protein kinase, other	TGGT1_207460B	-1.05874	Rab5B protein
TGGT1_251740	-1.64645	AP2 domain transcription factor AP2XII-9	TGGT1_280500	-1.0548	inorganic anion transporter, sulfate permease (SulP) family protein
TGGT1_210260	-1.5969	NAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase	TGGT1_235450	-1.05405	ubiquitin-conjugating enzyme subfamily protein
TGGT1_227810	-1.58897	rhopty kinase family protein ROP11 (incomplete catalytic triad)	TGGT1_216740A	-1.03546	riboflavin kinase
TGGT1_253060	-1.58388	WD domain, G-beta repeat-containing protein	TGGT1_206510	-1.03486	toxolysin TLN4
TGGT1_310010	-1.57889	rhopty neck protein RON1	TGGT1_262750	-1.03034	putative histone lysine methyltransferase, SET
TGGT1_225110	-1.55057	AP2 domain transcription factor AP2X-2	TGGT1_265500	-1.02653	chloride transporter, chloride channel (ClC) family protein
TGGT1_304650	-1.55016	histidine acid phosphatase superfamily protein	TGGT1_247195	-1.02633	microneme protein MIC15
TGGT1_220270	-1.54948	alveolin domain containing intermediate filament IMC6	TGGT1_299190	-1.02554	B-box zinc finger domain-containing protein
TGGT1_265780	-1.52983	flagellar/basal body protein	TGGT1_273780	-1.02378	SWI2/SNF2-containing protein
TGGT1_214080	-1.51301	toxofilin	TGGT1_248870	-1.0196	SNARE associated Golgi protein
TGGT1_250800	-1.50356	AP2 domain transcription factor AP2XII-8	TGGT1_202820	-1.01506	ubiquitin-conjugating enzyme subfamily protein
TGGT1_220230B	-1.50041	leucine rich repeat-containing protein	TGGT1_233810	-1.00851	Set1 repeat-containing protein
TGGT1_293240	-1.48441	triacylglycerol lipase	TGGT1_232360	-1.00811	exonuclease
TGGT1_216710	-1.47718	transporter, major facilitator family protein	TGGT1_227900	-1.00791	AP2 domain transcription factor AP2X-1
TGGT1_233090	-1.45286	XPG N-terminal domain-containing protein	TGGT1_262400	-1.00664	lipase
TGGT1_290020	-1.4372	cyclin dependent kinase binding protein	TGGT1_263785	-1.00419	phosphatidate cytidyltransferase
TGGT1_312100	-1.4227	plasma membrane-type Ca(2+)-ATPase A1 PMCAA1	TGGT1_285730	-1.00375	TBC domain-containing protein
TGGT1_246000	-1.41111	large subunit ribosomal protein IMG2	TGGT1_271580	#NAME?	Toxoplasma gondii family D protein
TGGT1_222430	-1.41042	HECT-domain (ubiquitin-transferase) domain-containing protein	TGGT1_279460	#NAME?	Toxoplasma gondii family B protein
TGGT1_310190	-1.41039	PIK3RA kinase-related protein (incomplete catalytic triad)	TGGT1_238460	#NAME?	SAG-related sequence SR522B
			TGGT1_239730	#NAME?	MORN repeat-containing protein



**ANEXO 30.** Principales familias asociadas a los DEGs a la baja en *T. gondii* al interactuar con PBMCs-h entre las 0 y 6 hpi.

Principales familias de proteínas expresadas a la baja en <i>T.gondii</i> durante la interacción con PBMCs-h negativos 0 vs 6			
Family	gene	log2(fold_change)	Product Description
ROPs	TGGT1_291960	-2.50284	rhopty kinase family protein ROP40 (incomplete catalytic triad)
	TGGT1_295125	-2.46334	rhopty protein ROP4
	TGGT1_295110	-2.36059	rhopty protein ROP7
	TGGT1_411430	-2.30985	rhopty protein ROP5
	TGGT1_315220	-2.27923	rhopty protein ROP14
	TGGT1_308090	-1.93753	rhopty protein ROP5
	TGGT1_203990	-1.78578	rhopty protein ROP12
	TGGT1_258660	-1.7598	rhopty protein ROP6
	TGGT1_215775	-1.72077	rhopty protein ROP8
	TGGT1_309590	-1.70724	rhopty protein ROP1
	TGGT1_363030	-1.66422	rhopty protein ROP8
TGGT1_227810	-1.58897	rhopty kinase family protein ROP11 (incomplete catalytic triad)	
Alveolinas	TGGT1_275670	-3.17306	alveolin domain containing intermediate filament IMC15
	TGGT1_226220	-2.89179	alveolin domain containing intermediate filament IMC9
	TGGT1_216000	-1.92439	alveolin domain containing intermediate filament IMC3
	TGGT1_231640	-1.74295	alveolin domain containing intermediate filament IMC1
	TGGT1_220270	-1.54948	alveolin domain containing intermediate filament IMC6
	TGGT1_224520	-1.38646	alveolin domain containing intermediate filament IMC8
AP2	TGGT1_318470	-3.28681	AP2 domain transcription factor AP2IV-4
	TGGT1_217700	-3.02414	AP2 domain transcription factor AP2XII-2
	TGGT1_202500	-2.50955	GAPM1a
	TGGT1_230150	-2.23593	ChAPs (Chs5p-Arf1p-binding proteins) protein
	TGGT1_237090	-2.06529	AP2 domain transcription factor AP2X-5
	TGGT1_251740	-1.64645	AP2 domain transcription factor AP2XII-9
	TGGT1_225110	-1.55057	AP2 domain transcription factor AP2X-2
	TGGT1_250800	-1.50356	AP2 domain transcription factor AP2XII-8
	TGGT1_288950	-1.36594	AP2 domain transcription factor AP2IX-4
	TGGT1_215570	-1.29552	AP2 domain transcription factor AP2X-11
	TGGT1_233120	-1.1094	AP2 domain transcription factor AP2VIII-2
	TGGT1_253380	-1.10264	AP2 domain transcription factor AP2III-2
	TGGT1_209080	-1.08331	transport protein particle (trapp) component, bet3 protein
	TGGT1_312570	-1.08233	CMGC kinase, MAPK family (ERK) MAPK-1
TGGT1_227900	-1.00791	AP2 domain transcription factor AP2X-1	
RONs	TGGT1_297960B	-3.75836	rhopty neck protein RON6
	TGGT1_223920	-3.12715	rhopty neck protein RON3
	TGGT1_300100	-2.90683	rhopty neck protein RON2
	TGGT1_306060	-2.58543	rhopty neck protein RON8
	TGGT1_308810B	-2.37081	rhopty neck protein RON9
	TGGT1_308810A	-2.30977	rhopty neck protein RON9
	TGGT1_297960A	-2.20096	rhopty neck protein RON6
	TGGT1_311470	-2.17568	rhopty neck protein RON5
	TGGT1_200230	-1.75538	microneme protein MIC17C
	TGGT1_310010	-1.57889	rhopty neck protein RON1
	TGGT1_213810	-1.0787	iron-sulfur cluster protein ISCA
	TGGT1_247195	-1.02633	microneme protein MIC15

### Anexo 31. Factores de transcripción mas relevantes en los DEGs resultantes de la interacción PBMCs humanos –*Toxoplasma gondii* en 0h vs 6 hpi en *MeExSs*

#### PBMCs CRO (1287 DEGs)

**TF E2F:** - Crucial en ciclo celular (CdKs) y en la acción de proteínas supresoras de tumores. Blanco de virus transformantes.

**TF ZF5 (muchas variantes):** Represores de transcripción. Mismos sitios de reconocimiento que TF Sp1 (activador).

**TF E2F2:** Ciclo celular.

**TCF-1:** Preserva la función efectora en células agotadas durante infecciones crónicas (virus).

**TF-AP-2 alfa, beta y gamma:** Reguladores ubicuos, sobre expresados en algunos carcinomas.

#### PBMCs NEG (828 DEGs)

**TF Sp1:** 12 000 BS en el genoma humano (Ubicuo), activador de genes reguladores del ciclo celular, involucrado en patrones de expresión específicos, apoptosis, cáncer.

**TF Sp2:** sobre expresado en algunos tipos de cáncer.

**TF BTBE1:** Represor e Integrante de de la familia TF Sp.

**TF KROX:** Regulación de colágeno I.

**TF-AP-2, alfa, beta y gamma:** Reguladores ubicuos, sobre expresados en algunos carcinomas.

**ANEXO 32. ACTA DE APROBACIÓN DEL COMITÉ DE BIOÉTICA.**

**UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO  
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD  
COMITÉ DE BIOETICA E INVESTIGACION DE LA FACULTAD CIENCIAS  
DE LA SALUD  
CONCEPTO BIOETICO**

ACTA 08 COMITÉ DE BIOETICA DE INVESTIGACION (Resolución 0600 del 29 de octubre de 2001) FECHA: 6 DE MAYO DE 2016

**NOMBRE DEL PROYECTO:** *Inmunoma (transcriptómica de células mononucleares de sangre periférica) en la toxoplasmosis ocular humana.*

**INVESTIGADOR PRINCIPAL:** Aylan Farid Arenas Soto

Este proyecto se basa en muestras de humor vítreo previamente obtenidas por médico oftalmólogo especializado y bajo custodia del Laboratorio de Biomédicas de la Universidad del Quindío – Grupo GEPAMOL y el programa de atención a pacientes con toxoplasmosis del Centro de Salud de la Universidad del Quindío. La utilización de las muestras con fines investigativos será consultada con los pacientes quienes suscribirán un consentimiento informado al convertirse en sujetos de investigación, ya que dicho documento no existe con anterioridad. Se verifica que no se trata de una población cautiva ni vulnerable.

De acuerdo a la **Resolución 008430** el proyecto cumple con lo establecido en el Capítulo 1, Título II relativo a la investigación en seres humanos., incluyendo lo concerniente a las disposiciones de un Consentimiento Informado previo válido.

Este proyecto implica la manipulación del Parásito *Toxoplasma Gondii*, clasificado por OMS en el Grupo de Riesgo II (Microorganismos que representan riesgo moderado para el individuo y limitado para la comunidad). **De acuerdo a la Resolución 008430 de 1993, el proyecto cumple** con lo establecido en el Título IV sobre

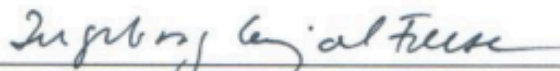
Bioseguridad de la Investigaciones, en su Capítulo I que trata de las investigaciones con microorganismos patógenos o material biológico que pueda contenerlo y, específicamente con lo que trata el ARTICULO 68: Los microorganismos que se clasifiquen en los grupos de riesgo I y II deberán manejarse en laboratorios de tipo básico de microbiología, empleando gabinetes de seguridad cuando se considere necesario.

**Los riesgos de contaminación ambiental son controlados mediante el seguimiento de protocolos y normas del Laboratorio de Ciencias Biomédicas de la Universidad del Quindío, relativos al manejo de residuos y patógenos de este tipo de muestra.**

De igual manera se da cumplimiento a lo establecido en el **Decreto 2676 del 2000 del Ministerio del Medio Ambiente**, con relación a la gestión integral de los residuos hospitalarios y similares.

Queda pendiente tramitar el permiso del Instituto Nacional de Salud para la manipulación de Organismos Modificados Genéticamente. El Comité realizará seguimiento al cumplimiento de este trámite.

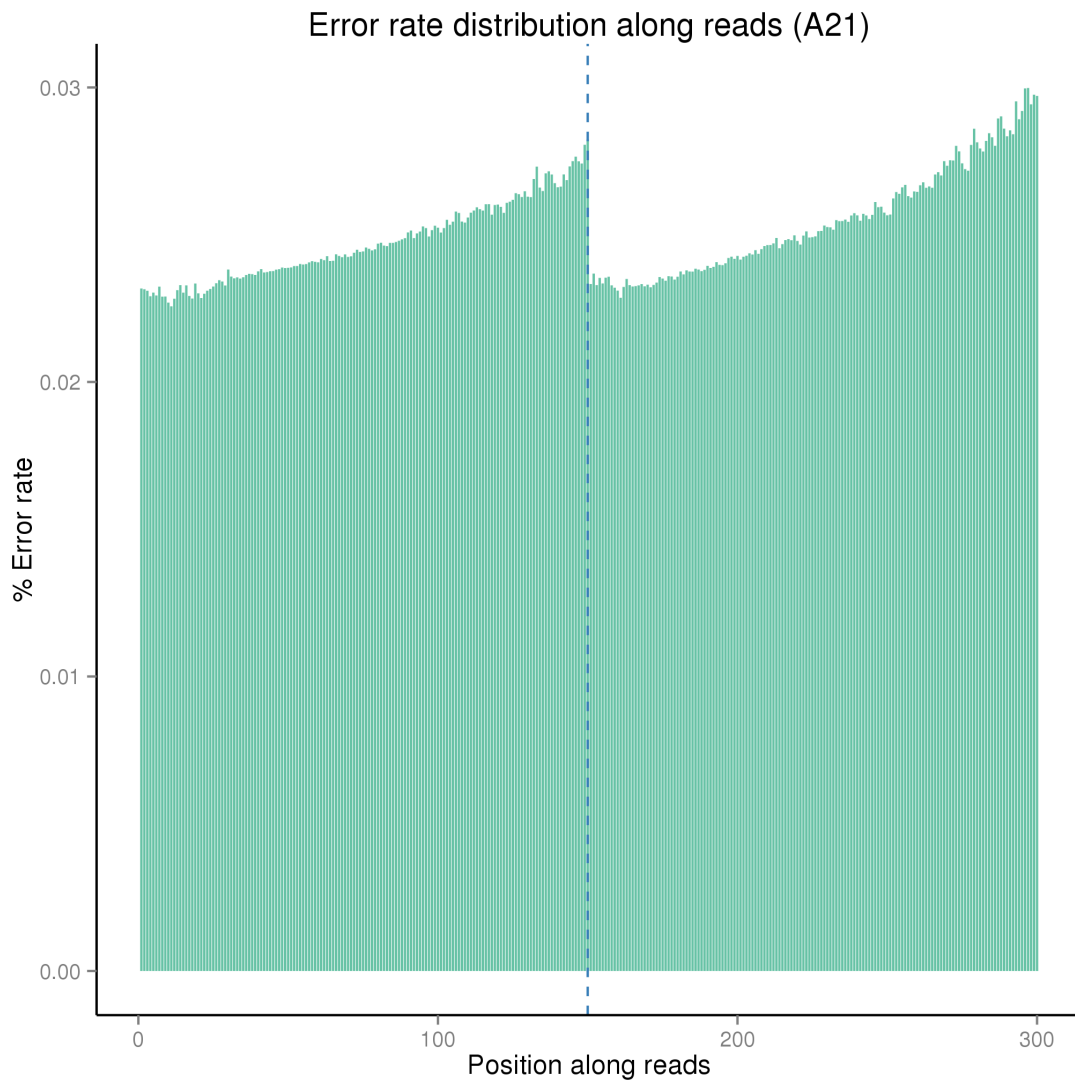
El proyecto cuenta con la debida autorizaciones de las instituciones donde se va a realizar la investigación



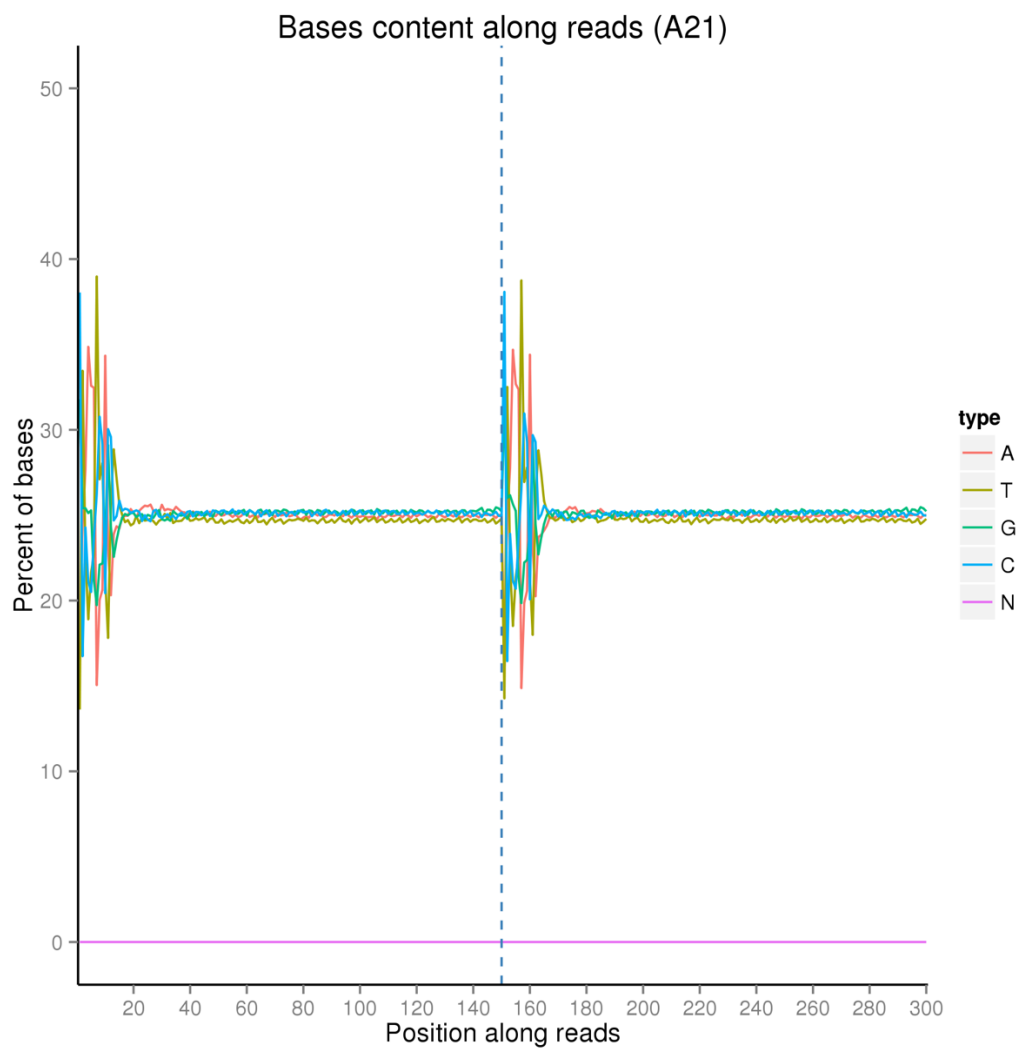
INGEBORG CARVAJAL FREESE MD, PHD

**Presidente Comité de Bioética e Investigaciones de la Facultad de Ciencias de la Salud**

**ANEXO 33.** Ejemplo (muestra A21) de control de calidad del rango de error de las lecturas en los transcriptomas.

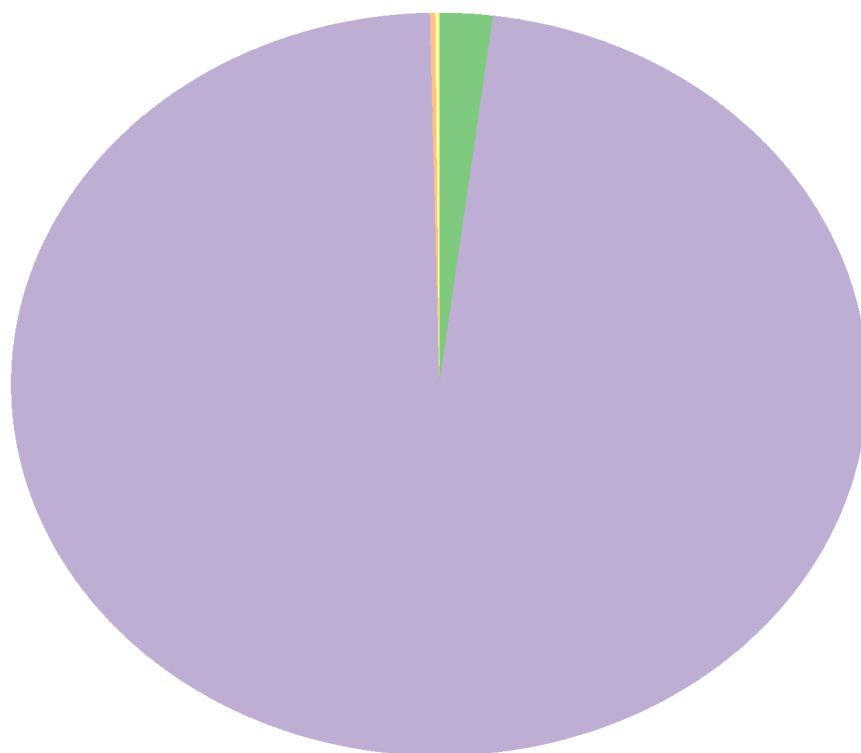


**ANEXO 34.** Ejemplo (muestra A21) de control de calidad del contenido de bases en los transcriptomas.



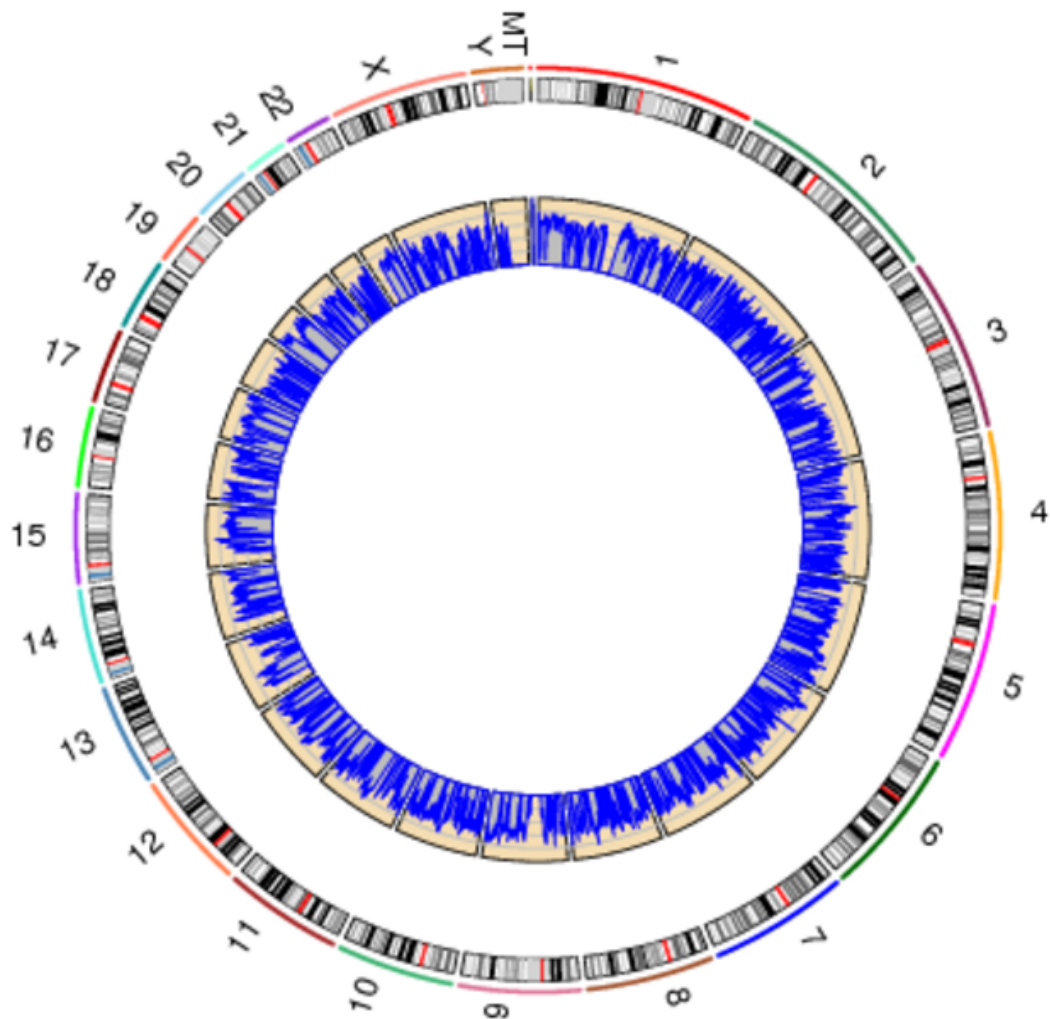
**ANEXO 35.** Ejemplo (muestra A21) de control de calidad de la clasificación de las lecturas en los transcriptomas.

### Classification of Raw Reads (A21)



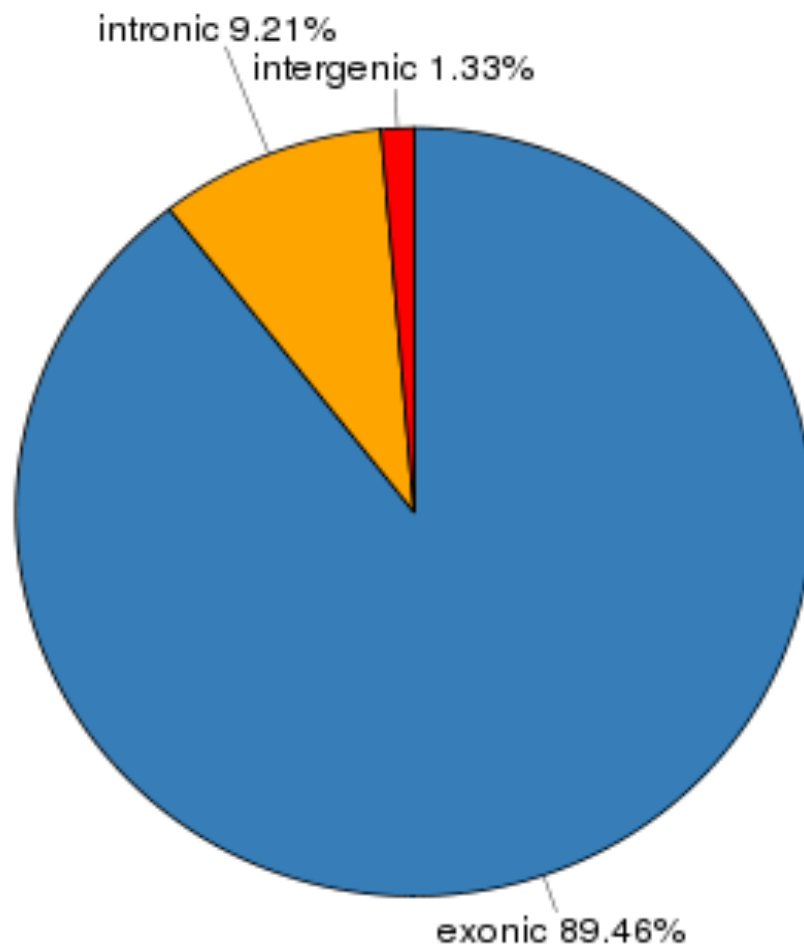
Clean Reads	(21988271, 97.64%)
Containing N	(34652, 0.15%)
Low Quality	(45245, 0.20%)
Adapter Related	(451102, 2.00%)

**ANEXO 36.** Ejemplo (muestra A21) de control de calidad de la distribución de de las lecturas en los en los cromosomas humanos.





**ANEXO 37.** Ejemplo (muestra A21) de control de calidad del porcentaje exónico de las lecturas en los en los transcriptomas humanos.



**ANEXO 38.** Constancia de Pasantía en Universidad Nacional de la Plata, Argentina.



La Plata, 30 de Enero de 2020.

Olga Alicia Nieto Cárdenas

MD, MPH, PhD

Coordinadora Doctorado en Ciencias Biomédicas Universidad del Quindío

De mi mayor consideración,

Me dirijo a Ud. para certificar que el alumno de doctorado John Alejandro Acosta Davila ha realizado una estancia de dos meses en mi laboratorio en la Universidad Nacional de la Plata. Dicha estancia de investigación se llevo a cabo del 23 de septiembre al 22 de Noviembre de 2019, donde el estudiante fue entrenado en técnicas de análisis de datos de RNA-seq. Quiero destacar que durante su estancia, el estudiante se ha desempeñado con dedicación y demostrando su excelente formación previa, contribuyendo a un desarrollo muy provechoso de su estancia.

Sin otro particular la saludo a Ud muy atentamente.

Dr. Luis Diambra

+542214236332

Email: [ldiambra@gmail.com](mailto:ldiambra@gmail.com)

Centro Regional de Estudios Genomicos--UNLP.

Bldv 120 No 1461, CP:1900 La Plata Argentina.

**ANEXO 39.** Constancia de pasantía en la universidad de Buenos Aires.



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica  
Laboratorio de Virología  
Ciudad Universitaria - Pabellón 2 - Piso 4  
1428 Buenos Aires - Argentina  
FAX 54-11-4576-3342  
TEL 54-11-4576-3334

Buenos Aires, 18 de diciembre de 2018

Olga Alicia Nieto Cárdenas  
MD, MPH, PhD  
Coordinadora Doctorado en Ciencias Biomédicas  
Universidad del Quindío

De mi mayor consideración,

le escribo para agradecer la confianza depositada en mi grupo de investigación y elegimos para que el estudiante de doctorado Alejandro Acosta realice una pasantía desde 9/11 al 10/12/2018.

Quiero destacar que la experiencia ha sido fabulosa.

El estudiante se ha dedicado de manera sostenida a realizar desarrollos experimentales que forman parte de un proyecto de investigación colaborativo, demostrando absoluto compromiso y poniendo en práctica su sólida formación que trae desde su prestigiosa institución, así como aprendiendo rápidamente nuevos conceptos y metodologías. Muy probablemente estos resultados puedan ser parte de una publicación en un futuro cercano y por supuesto que será incluido como co-autor. El estudiante ha asistido a seminarios de nuestro Instituto, así como a un Congreso Internacional y un encuentro científico nacional de altísimo nivel. La calificación por su desempeño es de 5/5.

Una vez más, les agradezco mantener y fortalecer nuestros vínculos académicos a través de este tipo de actividades.

La salud a Ud muy atentamente,

Cybele

Dra. Cybele García  
Lab. de Estrategias Antivirales, FCEyN, UBA  
Investigadora Independiente de CONICET  
Jefe de Trabajos Prácticos dedicación exclusiva, UBA

**ANEXO 40.** Portada artículo publicado como resultado de la pasantía en la universidad de Buenos Aires.



Research paper

**De novo design approaches targeting an envelope protein pocket to identify small molecules against dengue virus**



Emilse S. Leal<sup>a</sup>, Natalia S. Adler<sup>a, c</sup>, Gabriela A. Fernández<sup>a</sup>, Leopoldo G. Gebhard<sup>b</sup>, Leandro Battini<sup>a</sup>, Maria G. Aucar<sup>c</sup>, Mariela Videla<sup>a</sup>, María Eugenia Monge<sup>a</sup>, Alejandro Hernández de los Ríos<sup>f</sup>, John Alejandro Acosta Dávila<sup>f</sup>, María L. Morell<sup>f</sup>, Sandra M. Cordo<sup>f</sup>, Cybele C. García<sup>f</sup>, Andrea V. Gamarnik<sup>g</sup>, Claudio N. Cavasotto<sup>c, d, e</sup>, Mariela Bollini<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigaciones en Bionanociencias (CIBION), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) Godoy Cruz, 2390, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

<sup>b</sup> CONICET-Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Roque Sáenz Peña 352, B1876, Bernd, Buenos Aires, Argentina

<sup>c</sup> Computational Drug Design and Molecular Informatics Laboratory, Translational Medicine Research Institute (IMT), CONICET-Universidad Austral, Pilar-Derqui, Buenos Aires, Argentina

<sup>d</sup> Facultad de Ciencias Biomédicas, y Facultad de Ingeniería, Universidad Austral, Pilar-Derqui, Buenos Aires, Argentina


<sup>e</sup> Austral Institute for Artificial Intelligence, Universidad Austral, Pilar-Derqui, Buenos Aires, Argentina

<sup>f</sup> Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Química Biológica, Laboratorio de Estrategias Antivirales, CONICET, Instituto de Química Biológica (IQUBICEN), Buenos Aires, Argentina

<sup>g</sup> Fundación Instituto Leloir-CONICET, Av. Patricias Argentinas 435, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina Buenos Aires, Argentina

**ANEXO 41.** Certificado del premio obtenido en el “XII ENCUESTRO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS” y el “II ENCUESTRO ANDINO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS” organizado por la Asociación Colombiana de infectología ACIN 2020.




**ANEXO 42.** Certificado de curso sobre transcriptómica y RNAseq.

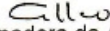
**La Universidad del Valle**  
**Facultad de Ciencias**  
**Naturales y Exactas**

*Certifica que:*  
**John Alejandro Acosta Davila**  
C.C 4.378.078

*Asistió al curso de:*  
**Uso de R para estudios de**  
**Transcriptómica y RNASeq**

Resolución N° 52 del 21 de marzo de 2019 Consejo de Facultad  
22 al 26 de abril de 2019: 40 Horas

  
El Decano

  
La Coordinadora de Área Académica

**ANEXO 43.** Certificado de socialización de avances del trabajo en el XI encuentro ACIN.



**ANEXO 44.** Certificado de socialización de avances del trabajo en el Bogotá Microbial meeting.





## Anexo 45. Consentimiento informado.

### DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARA PARTICIPANTES Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

**Título del Proyecto:** "Análisis Transcriptómico de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs) provenientes de individuos con Toxoplasmosis"

**Investigador principal:**

Jorge Enrique Gómez PhD

**Investigadores asociados:**

Hernan Lorenzi PhD.  
Ligia Alejandra de la Torre PhD.  
Alejandro Hernández M.Sc  
John Alejandro Acosta M.Sc  
Juliana Muñoz Ortiz MD

Laura Lorena García Est. M.Sc.  
Juan David Valencia Est. M. Sc  
Daniel Celis Giraldo Est. Medicina  
Manuela Mejía Oquendo Est. Medicina  
Mónica Vargas Montes M.Sc

**Resumen del proyecto**

*Toxoplasma gondii* es un parásito intracelular obligado que invade y se replica en casi todas las células nucleadas de la gran mayoría de vertebrados. *Toxoplasma gondii* es el segundo patógeno más importante de transmisión alimentaria generando importantes pérdidas económicas y un detrimento en la calidad de vida de las personas infectadas, especialmente en personas inmunocomprometidas. La infección por este parásito es una de las principales causas de discapacidad visual en pacientes de numerosos países, siendo responsable del 30 al 50% de los casos de uveítis en pacientes inmuno-competentes. En Colombia nuestro grupo de investigación (GEPAMOL) ha encontrado que los individuos crónicos pueden desarrollar la infección ocular con diferentes grados de severidad. Múltiples episodios de infección ocular, como lo son las recurrencias, conllevan a pérdida parcial de la visión o incluso en algunas personas a la ceguera. Se hace necesario entonces, conocer los genes humanos relacionados con la inmunidad que son alterados en su expresión durante la infección del parásito. Los estudios con células provenientes de individuos que padecen la enfermedad representan un muy valioso escenario para la comprensión de esta patología, pues esto permitiría conocer los genes y rutas de comunicación celular que están siendo moduladas por este parásito. Este proyecto permitirá entender mejor estos mecanismos genéticos y moleculares y contribuir al desarrollo de nuevas estrategias para el diagnóstico y tratamiento de esta afección.

**Invitación a participar**

Antes de tomar la decisión de participar en la investigación, tenga en cuenta que debe ser mayor de edad, encontrarse vinculado a una EPS y haber leído atentamente este formulario de consentimiento, que tiene como propósito orientarlo en su decisión. Si tiene alguna duda o no entiende algún término o idea presentada en este documento pregúntele a la persona que le presentó este documento que será uno de los investigadores asociados relacionados al inicio de este documento ya que estos tiene la disposición y la obligación de responderle.

El investigador principal Jorge Enrique Gomez Marin en ningun momento del estudio coaccionara su decision de participar ni será el encargado de presentarle este documento.

Nota Aclaratoria: En caso de ser menor de edad se requerira el consentimiento informado por parte de los padres de familia o su prepresentante legal (mayor de edad).

**Le invitamos para que participe en el proyecto de investigación: Análisis Transcriptómico de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs) provenientes de individuos con Toxoplasmosis.** El cual será llevado a cabo por el Grupo de Investigación en Parasitología Molecular (GEPAMOL) de la Universidad del Quindío en el centro de Investigaciones de ciencias Biomédicas.

**Aspectos a tener en cuenta durante el desarrollo de la investigación:**

- Los estudios de investigación en ciencias biomédicas buscan obtener información científica que puede ser útil al sector salud u otras personas en el futuro.

- Su participación es voluntaria. Usted puede rehusarse a participar, o puede retirar su consentimiento en cualquier momento y por cualquier motivo.

- Si usted quiere participar en este estudio es necesario firmar este consentimiento. El cual se realizará por duplicado para que usted reciba una copia de él. Aun si usted firma este consentimiento puede retirarse de estudio cuando usted desee sin ninguna repercusión negativa para usted.

- Usted puede preguntarle al investigador principal, Jorge Enrique Gómez Marín o a cualquier otro miembro del grupo de investigadores listados al comienzo de este documento, y también al quien le esta presentando el consentimiento informado, todas las dudas que tenga acerca de este estudio y puede realizarlo en cualquier momento de su ejecución. Podrá comunicarse directamente al siguiente teléfono al: **3206730037** o mediante correo electrónico **gepamol2@uniquindio.edu.com**.

**¿Para qué se está realizando este estudio?**

Esta investigación tiene como objetivo identificar algunos genes y proteínas de células del sistema inmune (defensa) asociados a casos de toxoplasmosis. Los resultados obtenidos a partir del estudio aportarán conocimientos básicos sobre algunos factores biológicos asociados a la enfermedad, los cuales servirán como base para la detección de biomarcadores y blancos terapéuticos con el fin de contribuir a la búsqueda de nuevas alternativas diagnósticas y de tratamientos mejor enfocados.

**Procedimiento del estudio**

Previa firma del consentimiento informado se realizará un examen oftalmológico integral y se tomará muestra de sangre de 8ml mediante punción venosa, esto con el fin de realizar un test anti-toxoplasma. En los individuos que se encuentre lesiones sugestivas de uveítis infecciosa se realizará en la misma muestra de sangre previamente tomada, pruebas para enfermedades infecciosas crónicas como

Herpes Virus, Citomegalovirus, Epstein Barr, y varicela zoster que podrían explicar también el origen de la lesión. En caso de confirmación de lesión debida a *Toxoplasma gondii*, usted será remitido a consulta con un especialista del Centro de salud de la Universidad del Quindío. En caso de que la lesión se explique por otras infecciones el investigador principal lo guiará en el proceso para el manejo en su entidad promotora de salud a la cual usted se encuentre afiliado. Es importante aclarar que sus datos serán manejados confidencialmente al ser codificados, es decir, solo el investigador principal conocerá sus datos personales y los investigadores asociados manejarán su muestra con un código.

Por otro lado solo si los análisis resultan positivos para toxoplasmosis y negativos para las otras infecciones mencionadas, se procederá a tomar una segunda muestra de sangre de 20 mL. Ambos procedimientos de punción venosa se llevarán a cabo en momentos diferentes y serán realizados por la auxiliar del laboratorio clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Quindío altamente capacitada para la toma de muestras, por lo cual el riesgo del procedimiento se cataloga como mínimo. A partir de la sangre proporcionada por usted, se separarán las células del sistema inmune que están encargadas de defender al cuerpo contra las enfermedades. Luego las células separadas de la sangre se pondrán en contacto con el parásito *Toxoplasma gondii* y se evaluará la respuesta inmune de éstas a través de diferentes técnicas de inmunología y biología molecular.

#### **¿Cuánto tiempo dura su participación?**

Su participación inicia desde el momento en que se realiza la firma del consentimiento y la toma de la muestra y durante los dos años de vigencia del proyecto. Esto no implica que usted deba estar presente durante los dos años sino que los datos generados a partir de su muestra serán utilizados durante todo este periodo. Aun así, usted puede notificar no formar parte del proyecto en cualquier momento del desarrollo del proyecto.

En caso de ser positivo para alguna enfermedad crónica diferente a toxoplasmosis, su participación en el estudio será finalizada, solo por razones investigativas que no tienen que ver con su edad, raza o género. Las razones se deben a que otro tipo de infecciones crónicas generarían información adicional y confusa, no propiamente relacionada con la toxoplasmosis ocular y con el objetivo general del presente proyecto investigación.

#### **¿Cuáles son los posibles beneficios para usted y la sociedad derivados de esta investigación?**

Su participación voluntaria en el estudio no le proporcionará ningún beneficio directo, pero le permitirá conocer si usted posee o no una infección crónica como las nombradas anteriormente, se le guiará en el proceso para que en caso de tener alguna obtenga el manejo médico pertinente..

Por otro lado, los resultados del estudio que solo tienen que ver con la toxoplasmosis, contribuirán al entendimiento de los factores inmunológicos asociados a la toxoplasmosis ocular, de esta manera, a largo plazo la información

generada a partir de la muestra suministrada por usted estaría aportando al beneficio de la población en general. Los resultados de la investigación y el análisis de la misma se publicarán en un formato de artículo científico, al cual tendrá acceso en el momento en que lo desee, una vez se entregue el informe final del proyecto. En dicho artículo científico en ningún momento aparecerá directamente su información confidencial como nombre, teléfono, diagnósticos etc.

#### **¿Usted presentará alguna afectación negativa por participar en el estudio?**

Los procedimientos que se le realizarán en el estudio no afectarán en ninguna medida su integridad física, todos los procedimientos serán realizados por personal experto en el área y estas actividades presentan un nivel de riesgo mínimo.

La información generada a partir de los exámenes realizados para infecciones como citomegalovirus pueden presentar cierta incertidumbre para usted pero estará acompañado en el proceso por el personal capacitado como lo es el médico investigador principal.

#### **Sus derechos como participante:**

Si usted decide participar en este estudio y luego cambia de opinión, tiene el derecho a retirarse del estudio en cualquier momento sin ninguna consecuencia desfavorable. Así mismo puede hacer las preguntas que considere importantes en cualquier momento.

#### **Confidencialidad de sus datos:**

Si acepta participar en el presente estudio, los resultados obtenidos serán confidencialmente manejados por el grupo de investigación GEPAMOL y archivo del Centro de Investigaciones Biomédicas al manejar sus muestras de y la información generada de manera codificada y no con su nombre.

#### **¿ Qué debe hacer si tiene preguntas acerca de este estudio o si decide terminar su participación en el estudio?**

Usted tiene la oportunidad de preguntar y obtener todas las respuestas a sus preguntas sobre esta investigación antes de firmar el consentimiento. Su participación en el estudio es voluntaria y usted puede negarse a participar, o retirarse del estudio en cualquier momento. Si usted decide suspender su participación en el estudio, puede llamar al teléfono **320 673 00 37** o mediante correo electrónico **gepamol2@uniquindio.edu.com**

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PERSONAL**

Me han explicado verbalmente y he leído la información proporcionada previamente. Yo \_\_\_\_\_ con cédula de ciudadanía No \_\_\_\_\_ voluntariamente acepto participar en este estudio. En constancia, firmo este documento de Consentimiento informado, en presencia del investigador y dos testigos, en la ciudad de Armenia el día \_\_\_\_ del mes de \_\_\_\_\_ del año \_\_\_\_\_.

Nombre completo, firma y documento de identidad de la persona que acepta participar en el estudio.

Nombre: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Cédula de Ciudadanía #: \_\_\_\_\_ de: \_\_\_\_\_

**INVESTIGADOR Y TESTIGOS**

Nombre completo, firma y documento de identidad del INVESTIGADOR

Nombre: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Cédula de Ciudadanía #: \_\_\_\_\_ de: \_\_\_\_\_

Nombre completo, firma y documento de identidad del TESTIGO NÚMERO 1

Nombre: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Cédula de Ciudadanía #: \_\_\_\_\_ de: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Relación o parentesco: \_\_\_\_\_

Nombre completo, firma y documento de identidad del TESTIGO NÚMERO 2

Nombre: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Cédula de Ciudadanía #: \_\_\_\_\_ de: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Relación o parentesco: \_\_\_\_\_

## Anexo 46. Diplomado en Bioética.



**FACULTAD**  
**CIENCIAS DE LA SALUD**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOMÉDICAS**

Certifican que

**Jhon Alejandro Acosta Dávila**  
C.C. 4.378.078

Asistió y cumplió satisfactoriamente con los requisitos exigidos para el **Diplomado en Bioética**. Realizado del 20 de agosto de 2016 al 10 de junio de 2017, con una intensidad de 264 horas teórico-prácticas.

  
**DR. JORGE ENRIQUE GÓMEZ MARÍN**  
Decano Facultad Ciencias de la Salud  
de la Universidad del Quindío

  
**OLGA ALICIA NIETO CARDENAS**  
Coordinadora Doctorado en Ciencias Biomédicas

  
**DANIEL MENESES CANMUNA**  
Docente en Bioética

**PERTINENTE CREATIVA INTEGRADORA**  
PARA MAYOR INTEGRACIÓN

[www.uniquindio.edu.co](http://www.uniquindio.edu.co)