

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA BIOLOGÍA

Identificación y clonación del gen que codifica la

Proteína Paraflagelar 2 y una secuencia parcial de la

Clatrina de Trypanosoma vivax

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la llustre Universidad Central de Venezuela por la bachiller Ana Victoria Ibarra Meneses como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

> Tutores: Lic. Bernardo González Lic. Roxana Gajardo

CARACAS, VENEZUELA

MARZO-2012



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA BIOLOGÍA

Identificación y clonación del gen que codifica la Proteína Paraflagelar 2 y una secuencia parcial de la Clatrina de Trypanosoma vivax

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la llustre Universidad Central de Venezuela por la bachiller Ana Victoria Ibarra Meneses como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

> Tutores: Lic. Bernardo González Lic. Roxana Gajardo

CARACAS, VENEZUELA

MARZO-2012

A mí Mamí por ser mí amíga, mí maestra, mí TODO.

Gracías por ser, estar y símplemente por EXISTIR.

"Las ciencias tienen las raíces amargas, pero muy dulces los frutos." Aristóteles

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación se ha dado gracias a la ayuda y colaboración de un grupo maravilloso de personas.

Inicialmente, quiero agradecerle al Lic. Bernardo González, mi tutor, por aceptarme en el laboratorio y brindarme su ayuda, sus conocimientos e inmensa colaboración.

A la Lic. Roxana Gajardo o como yo la llamo, mi profe Roxy, por ayudarme en este arduo trabajo y hacer ese gran esfuerzo que está haciendo, muchas gracias profe.

Agradecida infinitamente con mi grupo de laboratorio: Profe Armando, Profe Marta, Lucy, Alpi, Marianita, David, Yare, Caro, Mimi. Le doy las gracias a cada uno de ellos por su inmensa colaboración, compañía, consejos y conocimientos.

Por otro lado, estoy orgullosa de haber estudiado en la UCV, en la Facultad de Ciencias, en donde tuve la oportunidad de conocer personas increíbles. Agradezco a cada uno de mis profesores, que ayudaron en la formación de mi carrera. Agradezco a esas personitas que conocí como compañeras de clase y que ahora son mis mejores amigas con las que he compartido horas de estudio, informes, viajes, entre tantas cosas. Leli, Mariitaa, Lu, Vic, Nany GRACIAS, las quiero un mundo. A la Dra. Marisabel Gonzatti y su equipo de laboratorio por brindarme su ayuda y colaboración.

A la Dr. Guillermina Alonso le estoy eternamente agradecida. Gracias por su enseñanza a lo largo de la carrera, por sus consejos, su ayuda y gracias por haber sido mi jurado y haberme ayudado tanto.

A Camila Roffé por estar siempre pendiente de mí desde que era una pichoncita de biólogo hasta estos momentos tan importantes. Gracias. Ahora ya si puedo decirte colega.

Por útimo pero no menos importante, agradezco a mi familia, especialmente a la mejor mamá del mundo, a mi papi y a mi hermano por apoyarme siempre, por brindarme su apoyo y su inmenso amor.

A mi Josh, por su infinito apoyo, ayuda, confianza, amor y comprensión.

Gracias por confiar en mí.

Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento".

Marie Curie.

RESUMEN

La tripanosomosis bovina es una enfermedad fatal en bovinos, ovinos, caprinos y bufalinos, siendo Trypanosoma vivax su agente causal en Venezuela. Como todos los tripanosomatideos, presenta un flagelo situado en la parte anterior del parásito, que le otorga la movilidad. En el interior del flagelo, se encuentra el filamento paraflagelar (PFR). Entre las distintas proteínas que conforman el PFR se encuentran la proteína paraflagelar 2 (PFR2). La PFR2 es una proteína estructural que cumple un rol importante en la motilidad del parásito. T. vivax también presenta una invaginación profunda de la membrana plasmática en la base del flagelo, conocida como bolsillo flagelar. Esta estructura está asociada a los procesos endocíticos y de secreción de moléculas. Diversas proteínas están implicadas en estos procesos, entre ellas se encuentra la clatrina (CLH), una proteína estructural que recubre las vesículas en el proceso de transporte trans-membrana y está asociada en la incorporación de nutrientes al interior del parásito. El objetivo de este trabajo fue identificar y clonar el gen que codifica la PFR2 y la secuencia parcial de la CLH de un aislado venezolano (TvLIEM176) de T. vivax. Para ello, se realizaron estudios bioinformáticos que permitieron predecir la secuencia putativa de cada gen. De la secuencia obtenida se diseñaron cebadores para amplificar por PCR el gen que codifica la PFR2 (PFRFF/R) y la secuencia parcial de la CLH (CLHF/R), obteniéndose un único fragmento de 1800pb y de 535pb, respectivamente. El producto de PCR correspondiente al gen que codifica la PFR2 fue tratado con EcoRV, obteniéndose dos fragmentos, de 1152pb y de 648pb. El producto de PCR correspondiente a la secuencia parcial de la CLH se trató con la enzima KpnI, generando bandas de 432pb y de 103pb, ambas acordes con el tamaño esperado según el mapa de restricción obtenido por bioinformática. Se realizó la clonación de cada inserto en el vector p-GEMT easy. Las colonias fueron analizadas por de restricción PCR con enzimas v secuenciadas colony. tratadas automaticamente. La secuencia del clon se comparó con la secuencia putativa obtenida por bioinformática del gen que codifica la PFR2 y la secuencia parcial de la CLH, mostrando 95% y 99% de identidad respectivamente, siendo éstos los primeros reportes del gen que codifica la PFR2 y la secuencia parcial de la CLH de un aislado en Venezuela de T. vivax. Además, se presume que estas dos proteínas podrían servir como posible inmunógeno para el control de la tripanosomosis bovina en Venezuela.

INDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN1
1.1 Tripanosomosis1
1.2 Trypanosoma vivax2
1.1.1 Clasificación de <i>T. vivax.</i>
1.1.2 Ciclo de vida de <i>T. vivax</i>
1.1.3 Distribución de <i>T. vivax</i> 5
1.1.4 Características morfológicas de <i>T. vivax</i> 7
1.1.4.1 Filamento paraflagelar (PFR)10
Proteína paraflagelar 2 (PFR2)13
1.1.4.2 Bolsillo flagelar 14
1.4.1.2.1 Mecanismos de transporte 16
Vía endocítica16
Vía secretora17
1.1.4.2.2 Proteínas del bolsillo flagelar
Clatrina (CLH)19
2. ANTECEDENTES
2.1 Proteínas paraflagelares (PFR1-PFR2)23
2.2 Clatrina (CLH)

3.	OBJETIVOS
(Dbjetivo general
(Objetivos específicos29
4.	METODOLOGÍA
4	.1 Obtención de ADN de T. vivax, TvLIEM176, a partir de la infección de
U	in ovejo sano
	4.1.1 Grupo experimental
	4.1.2 Características del aislado
	4.1.3 Infección experimental
	4.1.4 Evaluación parasitológica
	4.1.5 Purificación de un aislado venezolano de <i>T. vivax.</i>
	4.1.6 Extracción de ADN genómico a partir de <i>T. vivax</i> purificado
4	.2 Diseño de cebadores para la amplificación del gen que codifica la
]	SvPFR2 y la Tv _n CLH
	4.2.1 Obtención de la secuencia de los genes que codifican la TvPFR2 y la
	Tv _n CLH
	4.2.2 Diseño de cebadores del gen que codifican la TvPFR2 y la Tv _n CLH. 37
4	A Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
	4.3.1 Purificación del producto de PCR
	4.3.2 Secuenciación del producto de PCR40

4.3.2.1Análisis de las secuencias.40
4.3.3 Confirmación de la secuencia por corte con enzimas de restricción del
producto de PCR41
4.4 Obtención de los clones pGEMT/TvPFR2 y pGEMT/Tv _n CLH43
4.4.1 Preparación de las células electrocompetentes de E. coli TOP10 43
4.4.2 Reacción de ligación para la formación de los vectores
pGEMT/TvPFR2 y pGEMT/TvnCLH44
4.4.3 Transformación45
4.4.4 Ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa de la colonia
recombinante (PCR colony)46
4.4.5 Extracción de plásmido (Miniprep)48
4.4.6 Cortes con enzimas de restricción de los plásmidos recombinantes50
4.5 Análisis de la secuencia de nucleótidos de los clones obtenidos50
4.5.1 Análisis de la secuencia de nucleótidos de los clones TvPFR2 y
Tv _n CLH51
4.5.2 Alineamiento de las secuencias
4.5.3 Árbol filogenético basado en el análisis de la secuencia de cada
proteína de diferentes organismos52
4.5.4 Análisis antigénico de la proteína PFR2 y la secuencia peptídica parcial
de la CLH

5.	RESULTA	ADOS	53
4	5.1 Proteín	a paraflagelar 2 de <i>T. vivax</i> (TvPFR2)	53
	5.1.1 Obte	ención de ADN de <i>T. vivax</i> de un ovino sano	53
	5.1.2 Dise	eño de los cebadores a partir de la secuencia putativa del ge	en que
	codifica	a la PFR2	53
	5.1.2.1	Diseño de los cebadores TvPFRF y TvPFRR	55
	5.1.3 Ensa	ayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) pa	ara la
	amplifi	icación del TvPFR2	55
	5.1.3.1	Purificación del producto de PCR del TvPFR2	57
	5.1.3.2	Corte con enzimas de restricción	58
	5.1.3.3	Secuenciación de TvPFR2	59
	5.1.4 Clor	nación del TvPFR2 en el vector de clonación pGEM-T easy	60
	5.1.4.1	Obtención de colonias recombinantes	60
	5.1.4.2	Determinación de la presencia del TvPFR2 por PCR	de la
	colonia		61
	5.1.4.3	Extracción de plásmidos (Miniprep)	62
	5.1.4.4	Cortes con enzimas de restricción	63
	5.1.5 Com	nparación y análisis de la secuencia del TvPFR2.	64
	5.1.5.1	Árbol filogenético de la proteína PFR2	68
	5.1.5.2	Características Físico-Químicas de la proteína PFR2	69

5.2 Secuencia parcial de la clatrina de <i>T. vivax</i> (Tv _n CLH)71
5.2.1 Obtención de ADN de <i>T. vivax</i> de un ovino sano71
5.2.2 Diseño de los cebadores a partir de la secuencia putativa de la
secuencia parcial de la clatrina71
5.2.2.1 Diseño de los cebadores TvCLHF y TvCLHR72
5.2.3 Ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la
Tv _n CLH73
5.2.3.1 Purificación del producto de la TvnCLH
5.2.3.2 Corte con enzimas de restricción
5.2.3.3 Secuenciación de la Tv _n CLH 77
5.2.4 Clonación de la Tv _n CLH en el vector de clonación pGEM-T easy 77
5.2.4.1 Obtención de colonias recombinantes
5.2.4.2 Determinación de la presencia de la Tv _n CLH por PCR colony79
5.2.4.3 Extracción de plásmidos (Miniprep)80
5.2.4.4 Cortes con enzimas de restricción
5.2.5 Comparación y análisis de la secuencia de la Tv _n CLH82
5.2.5.1 Árbol filogenético de la secuencia parcial peptídica de la CLH. 84
5.2.5.2 Características Físico-Químicas de la proteína PFR2 y la
secuencia peptídica parcial de la CLH. 85
7. CONCLUSIONES

8.	PERSPECTIVAS	102
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
10.	ANEXOS	115

Tabla 1. Componentes de la mezcla usada para realizar el corte con la enzima de
restricción EcoRV del producto de PCR del gen que codifica la
PFR242
Tabla 2. Componentes de la mezcla usada para realizar el corte con la enzima de restricción <i>Kpn</i> I del producto de PCR de la secuencia parcial de la CLH42
Tabla 3. Reactivos usado en la ligación entre el vector pGEMT y el producto
purificado de PCR del TvPFR2 y de la Tv _n CLH45
Tabla 4. Secuencia nucleotídica de los cebadores SP6 y T7 que amplifican el inserto de interés. 47
Tabla 5. Componentes de la mezcla de reacción para la amplificación de los
genes con los cebadores SP6 y T747
Tabla 6 . Condiciones del ciclado del PCR de las colonias. 48
Tabla 7. Secuencia de los cebadores que amplifican el gen que codifica la PFR2.
Tabla 8. Componentes de la mezcla de reacción para la amplificación del
1vPFR2
Tabla 9. Condiciones de ciclado para la amplificación del gen que codifica la PFR2

Tabla 10. Secuencia de los cebadores internos que amplifican regiones del gen
putativo de la proteína PFR265
Tabla 11. Estudio comparativo, con base en el BLAST, entre el TvPFR2 con
distintos organismos a nivel de la cobertura y de la identidad máxima en
nucleótidos
Tabla 12. Estudio comparativo a nivel de la secuencia aminoacídica del TvPFR2
mediante alineamiento con otros tripanosomatideos
Tabla 13. Secuencia de los cebadores que amplifican la secuencia parcial de la
CLH
Tabla 14. Componentes de la mezcla de reacción para la amplificación de la
Tv _n CLH73
Tabla 15 . Condiciones de incubación para la amplificación de la Tv_nCLH74
Tabla 16 . Estudio comparativo de los nucleótidos de la Tv_nCLH , de la colonia 4,

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Longitud de un <i>T. vivax</i>
Figura 2. Ciclo biológico de <i>T. vivax</i>
Figura 3. Distribución geográfica de <i>T. vivax.</i>
Figura 4. Esquema de un <i>Trypanosoma sp.</i>
Figura 5. Corte transversal del flagelo de <i>Trypanosoma</i> sp
Figura 6. Esquema del bolsillo flagelar de <i>Trypanosoma</i> 15
Figura 7. Estructura de la clatrina
Figura 8. Endocitosis mediada por clatrina21
Figura 9. Secuencia aminoacídica de la CLH
Figura 10. Secuencia nucleotídica putativa del gen que codifica la PFR2 de
TvY486 de 1800 pb, obtenida según las bases de datos. Mostrando el anclaje
(hibridación) de los iniciadores TvPFRF/R
Figura 11. Registro digital de la corrida electroforética de los productos de
amplificación por PCR del TvPFR2 en un gradiente de temperatura de
hibridación, con los cebadores TvPFRF y TvPFRR57
Figura 12. Registro digital de la corrida electroforética del producto de PCR
purificado del TvPFR258
Figura 13. Mapa de restricción de la secuencia putativa del gen que codifica la
PFR2 utilizando el programa NEBCUTTER

Figura 14. Registro digital de la corrida electroforética de los productos del corte
con la enzima EcoRV del TvPFR259
Figura 15. Placas LB con la transformación en E. coli. TOP10/PFR2/pGEMT61
Figura 16 Registro digital de la corrida electroforética de los productos de PCR
de las colonias obtenidas de la transformación del TvPFR262
Figura 17. Registro digital de la corrida electroforética de los productos de ADN
plasmídico purificado correspondientes al TvPFR263
Figura 18. Registro digital de la corrida electroforética de los productos de la
digestión del ADN plasmídico de la colonias 1 y 2, que poseen el TvPFR2, con
las enzimas <i>Eco</i> RI y <i>Eco</i> RV64
Figura 19. Registro digital de la corrida electroforética de los productos de PCR
con los cebadores SP6 y T7, TvPFRF y TvPFRR; TvPFRF1 y TvPFRR1;
TvPFRF2 y TvPFRF265
Figura 20. Alineación entre la secuencia del TvPFR2, de la colonia 1, y la
secuencia del TvY486PFR2, utilizando el programa Multialin66
Figura 21. Árbol filogenético de la secuencia aminoacídica de la PFR2 de
distintos tripanosomatideos
Figura 22. Predicción de antigenicidad, hibrofobicidad, hidrofibicidad y
accesibilidad al solvente de la proteína PFR2 de TvLIEM176, utilizando el
programa Antheprot70

Figura 23. Secuencia nucleotídica putativa de la secuencia parcial de la CLH de
TvY487 de 535 pb, obtenida según las bases de datos. Mostrando el anclaje de
los cebadores TvCLHF/R72
Figura 24. Registro digital de la corrida electroforética de los productos de
amplificación por PCR de la TvnCLH en un gradiente de temperatura de
hibridación, con los cebadores TvCLHF y TvCLHR74
Figura 25. Registro digital de la corrida electroforética de los productos de PCR
purificado de la Tv _n CLH75
Figura 26. Mapa de restricción de la Tv_nCLH utilizando el programa
NEBCUTTER
Figura 27. Registro digital de la corrida electroforética de los productos del
corte con la enzima de restricción <i>Kpn</i> I de la Tv _n CLH76
Figura 28. Alineamiento de la secuencia de la Tv_nCLH , obtenida por
secuenciación automática, con la secuencia parcial putativa de la CLH de
TvY486, utilizando el programa Multialin77
Figura 29. Transformación en <i>E. coli</i> TOP10/Tv _n CLH/pGEMT78
Figura 30. Registro digital de la corrida electroforética de los productos PCR de
las colonias obtenidas de la transformación de la Tv _n CLH79
Figura 31 Registro digital de la corrida electroforética de los productos de
ADN plasmídico purificado correspondientes a la Tv _n CLH80

Figura 32. Registro digital de la corrida electroforética de los productos de la
digestión del ADN plasmídico de las colonias que poseen la TvCLH, con las
enzimas <i>Eco</i> RI y <i>Kpn</i> I
Figura 33. Alineación a nivel de nucleótidos de la Tv_nCLH , de la colonia 4, con
la secuencia parcial de la CLH de TvY486, utilizando el programa Multialin82
Figura 34. Árbol filogenético de la secuencia peptídica de la CLH de
TvLIEM176
Figura 35. Predicción de antigenicidad, hibrofobicidad, hidrofibicidad y
accesibilidad al solvente del gen que codifica la CLH de TvY486 utilizando el
programa Antheprot
Figura 36. Secuencia nucleotídica del sitio de inserción del los cebadores T7/SP6,
correspondiente al vector pGEMT
Figura 37. Mapa del vector pGEMT easy. En el lateral se observan las enzimas
de restricción que cortan el vector

ABREVIACIONES

ADN: Ácido desoxirribonucléico

ADN_{0.i}: ADN ovino infectado

AG: Aparato de Golgi

Amp: Ampicilina

Blast: Basic local alignment search tool

BSA: Albúmina sérica bovina

CLH: Clatrina

CRAM: Proteína de membrana rica en cisteína

° C: Grados centígrados

DEAE: Dietilaminietil

dNTPs: Desoxinucleótidos-trifosfato (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)

D.O: Densidad óptica

EDTA: Ácido etilendiamino tetraaacético

FAZ: Zona de adhesión al flagelo

HDL: Lipoproteína de alta densidad

HPHBr: Receptor de haptoglobina-hemoglobina

Ig: Inmunoglobulina

IPTG: isopropil-β-D-tiogalactósido

ISG: Glicoproteínas invariantes de superficie

Kb: Kilobases

Medio LB: Medio Luria-Bertani

MgCl₂: Cloruro de magnesio

min: minutos

mL: Mililitro

µL: microlitros

mM: Milimolar

NaCl: Cloruro de sodio

NCBI: National Center for Biotechnology Information

O.N: Overnight (toda la noche)

ORF: Marco abierto de lectura

PBS: Buffer fosfato sódico

PBSG: Buffer fosfato sódico glucosado

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PFR: Filamento paraflagelar

PFR1: Proteína paraflagelar 1

PFR2: Proteína paraflagelar 2

RE: Retículo endoplasmático

SDS: dodecilsulfato sódico

T.A: Temperatura ambiente

TAE: Tris-acetato-EDTA

T.E: Buffer Tris-EDTA

Taq: ADN polimerasa de Thermus aquaticus

T. brucei: Trypanosoma brucei

T. cruzi: Trypanosoma cruzi

T. evansi: Trypanosoma evansi

TFR: Receptor de transferrina

Tryp/mL: Trypanosoma/mililitro

T. vivax: Trypanosoma vivax

TvPFR2: Gen que codifica la PFR2 de T. vivax

Tv_nCLH: Secuencia parcial de la región N-terminal de la CLH de T. vivax

U.E.G.F: Unidad de estudios genéticos y forenses

V: Voltios

VSG: Glicoproteínas variantes de superficie

xg: Fuerza centrífuga

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Tripanosomosis

La tripanosomosis animal es una enfermedad debilitante y comúnmente fatal en los animales domésticos, especialmente en bovinos y pequeños rumiantes de diferentes edades, sexos y razas, producida por diferentes especies de tripanosomas (Dávila y Silva, 2000; Tafur y col., 2002). Entre los síntomas principales se presentan fiebre, anemia severa, trastornos reproductivos, pérdida de la condición corporal, y de la capacidad reproductiva tanto en machos como en hembras, lo que trae como consecuencia pérdidas significativas en la producción de carne y leche y muertes ocasionales (De Stefano y col., 1999; Desquesnes, 2004).

T. vivax es considerado el principal agente causal de la tripanosomosis bovina a nivel mundial (Rivera, 1996). Dicha enfermedad presenta tres fases durante la infección: La fase prepatente, la fase aguda y la fase crónica. La fase prepatente oscila desde la inoculación del parásito hasta que aparecen los parásitos en sangre. Posteriormente, se encuentra la fase aguda, caracterizada por altas parasitemias, encontrándose alrededor de 10^6 parásitos/mL, junto con un aumento de la temperatura y una disminución del hematocrito (Rivera, 1996). Finalmente, si el animal supera estas altas parasitemias, se encuentra la fase crónica, que puede durar meses e incluso años. Esta etapa se caracteriza por niveles bajos de hematocrito y hemoglobina, observándose hemorragias por la superficie de las mucosas, cavidad corporal, músculos, corazón, ganglios linfáticos y baja parasitemia, persistiendo la anemia en ausencia de parásitos en sangre (Gardiner, 1989; Anosa, 1988; Suárez y col., 2003).

1.2 Trypanosoma vivax

La presencia de *T. vivax* en América, fue reportada por primera vez por Leger y Vienne en 1919, en la Guayana Francesa, desde entonces se ha extendido en el continente llegando a Brasil y a tierras bajas de Bolivia. Se cree que este parásito llegó al continente americano desde África mediante bovinos infectados (Curasson, 1943) y después se difundió a distintas regiones del continente a causa de los traslados de los animales. En Venezuela, fue identificado por primera vez por Tejera (1920) y desde ese momento, se han realizado estudios acerca de su morfología, fisiología, relación parásito-hospedador, así como los aspectos clínicos de la enfermedad.

T. vivax es un hemoparásito, flagelado, unicelular eucariota que afecta principalmente a bovinos, ovinos, caprinos, camélidos y bufalinos; siendo los bovinos los principales hospedadores y los búfalos los menos susceptibles (Dávila y Silva, 2000). Entre los rasgos morfológicos más destacados, se encuentran: una membrana ondulante bien desarrollada y adosada a un flagelo libre, el cinetoplasto redondeado y pequeño, cercano al extremo posterior del parásito el cual finaliza en forma cónica y un núcleo redondeado, ubicado en posición central (Hoare, 1972).

Según Legar y Vienne (1919), en las cepas suramericanas existen variaciones de tamaño de 16 a 26,5 μ m de longitud y un ancho de 1-3 μ m. Estudios realizados por Goméz (2011) de las dimensiones del parásito indican que el tamaño de *T*. *vivax* en Venezuela, oscila entre 18 y 24 μ m de largo (en promedio 21,00 ± 2,00 μ m) (Figura 1).



Figura 1. Longitud de un T. vivax. (Cortesía del Dr. Ely Gómez).

1.1.1 Clasificación de T. vivax.

Taxonómicamente de acuerdo a Levine y colaboradores (1980) y Soulsby (1987), *T. vivax* se clasifica de la siguiente forma:

Reino Animalia Subreino Protozoa Phylum Sarcomastigophora Subphylum Mastigophora Clase Zoomastigophora Orden Kinetoplastida Suborden Trypanosomatina Familia Trypanosomatidae Género Trypanosoma Subgénero: Duttonela Especie vivax.

En 1972, Hoare divide el género *Trypanosoma* en dos importantes secciones. La Sección Stercoraria, que son flagelados metacíclicos que se desarrollan en el tubo digestivo del vector y son transmitidos por las heces. Se caracterizan por presentar un gran cinetoplasto, su extremo posterior es en punta aguda y se multiplican de manera discontinua en los vertebrados, como amastigotes o epimastigotes. Por otro lado, la

sección Salivaria, son flagelados metacíclicos que se transmiten a través de glándulas salivales del vector. Estos organismos se caracterizan por la terminación en punta redondeada (Alves y col., 2008) y se multiplican de una manera continua como tripomastigotes (Brener, 1979). Según la clasificación de Hoare (1972), *T. vivax* se ubica en la Sección Salivaria.

1.1.2 Ciclo de vida de T. vivax.

En África, *T. vivax* es transmitido cíclicamente por la mosca tsetsé y mecánicamente por otras moscas hematófagas (Figura 2A). Mientras que en el continente Americano la transmisión es de tipo mecánica (Figura 2B), cuyos vectores son las moscas de los establos y tábanos (Hoare, 1972).



Figura 2. Ciclo biológico de *T. vivax*. A) Transmisión cíclica (Modificado de Desquesnes, 2004) B) Transmisión mecánica (Modificado de Gardiner y col., 1989)

La transmisión cíclica requiere de la participación de dos hospedadores: 1) Invertebrados (dípteros hematófagos), como *Glossina* sp y 2) Vertebrados (mamíferos). Dentro del díptero hematófago, el parásito es capaz de multiplicarse y permanecer en la fase infectiva durante toda la vida del insecto; desarrollándose en la proboscis del díptero donde la forma tripomastigote se transforma en epimastigote. El paso más importante es la formación de los tripomastigotes metacíclicos que son los únicos que infectan a los hospedadores vertebrados (Figura 2A) (Osorio y col., 2008).

En América, debido a la ausencia de la mosca tsetsé, la transmisión de *T. vivax* se hace de forma mecánica, principalmente por dípteros como Tabanidae y *Stomoxys* sp, sin la multiplicación ni crecimiento del parásito en el hospedador invertebrado. Por lo que la transmisión es directa, y el parásito es capaz de dividirse dentro del hospedador mamífero por fisión binaria (Figura 2B). La transmisión también puede darse mediante el uso de agujas e instrumentos contaminados (vía iatrogénica) (Hoare, 1972).

1.1.3 Distribución de T. vivax

T. vivax está ampliamente distribuido a nivel mundial, siendo las zonas tropicales de África y América de Sur las de mayor impacto. Así mismo se han encontrado reportes en el Este de la India (Hoare, 1972). En Latinoamérica, la tripanosomosis está distribuida desde Centro América hasta Suramérica, siendo los países más afectados: Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guyana francesa, Panamá, Paraguay, Perú y Venezuela (Figura 3). Existen reportes de una región de Brasil, conocida como el Pantanal, que colinda con Bolivia, donde en

1988 hubo un gran brote, que causó la expansión de *T. vivax* en ambos países. (Seild y col., 1999; Gonzales y col., 2007).



Figura 3. Distribución geográfica de *T. vivax*. Las líneas amarillas sesgan la distribución de *T. vivax* a nivel mundial (Cortesía Dr. Armando Reyna).

En Venezuela, este patógeno está ampliamente distribuido por todo el país, presentando una mayor prevalencia en zonas ganaderas bovinas (llanos venezolanos) (Toro y col., 1980; Wells, 1987; Tamasaukas y col., 2006). Reportes de Toro (1990) confirman que en la región de los llanos se encuentra la mayor prevalencia de tripanosomosis bovina en Venezuela (39%). Otros investigadores, como Reyna (2007), demuestran la presencia de *T. vivax* en el estado Miranda, Sur del estado Guárico, Anzoátegui y Monagas. Por otro lado, Simoes y colaboradores (2009) realizaron estudios en las diferentes zonas ganaderas de Venezuela, reportando el parásito en los llanos, en el sur de lago de Maracaibo y en las regiones centro occidental andina.

Debido a que la tripanosomosis bovina ocasiona en los hospedadores debilitamiento, enflaquecimiento, pérdida en la condición corporal, transtornos reproductivos, entre otros, que traen como consecuencia una disminución de los productos derivados de los mismos, como la leche, la carne y el queso. Todo esto, afecta a la producción pecuaria, ya que al haber escases de los productos hay un aumento de los precios. Desquesnes (2004), señaló el impacto económico de la tripanosomosis en el ganado en Venezuela, indicando una tasa de mortalidad cercana al 40%. Por lo que, es importante el estudio de este hemoparásito, ya que hay pocos reportes. En este trabajo lo que se quiere es identificar proteínas que sirvan como diana terapéutica para el control de la tripanosomosis en Venezuela.

1.1.4 Características morfológicas de T. vivax

La estructura de *T. vivax* está constituida por diferentes organelos que son fundamentales para el desarrollo y supervivencia del parásito. A nivel de su organización interna, *T. vivax* presenta una sola mitocondria en forma reticular que se extiende a todo lo largo del cuerpo del flagelado. En el interior de la mitocondria, situado en las adyacencias del cuerpo basal del flagelo, se encuentra aglomerado el ADN mitocondrial, formando una estructura conocida como cinetoplasto (Figura 4) (Bastin y col., 2000; Field y Carrington, 2009).



Figura 4. Esquema de un *Trypanosoma sp*. El diagrama es un bosquejo que muestra la localización de organelos y estructuras principales. **mp**, membrana plasmática; **za**, zona de adhesión; **tv**, estructura tubulovesicular; **f**, flagelo; **ap**, aparato de golgi; **re**, retículo endoplasmático; **ms**, microtubulos subpeliculares; **bf**, bolsillo flagelar; **c**, cinetoplasto; **v**, vesículas; **l**, lisosoma; **n**, núcleo. **m**, mitocondria; **gly**, glicosoma. (Modificado de Landfear e Ignatushchenko, 2001).

El citoplasma es rico en gránulos y vesículas, en él se encuentran lisosomas y material lípidico (lipo-proteico o glico-proteico) (Bastin y col., 2000). Adicionalmente, en el citoplasma se observa organelos acídicos que acumulan grandes cantidades de calcio y polifosfato conocidos como ácidocalcisomas (Kornberg, 1995), siendo estos el principal reservorio de cationes y fósforo, además participan en el metabolismo del polifosfato, de la homeostasis del calcio, del mantenimiento del pH intracelular y de la regulación osmótica (Do Campo, 2005). También se observan glicosomas, que son organelos que poseen una forma ovalada o redondeada, cubiertos de una sola membrana. En los glicosomas se localizan enzimas glicolíticas, que son de vital importancia para la supervivencia del parásito y actúan como contenedores de actividades metabólicas (Michels y col., 2000).

El núcleo se encuentra rodeado por un envoltorio compuesto por dos membranas yuxtapuestas que presentan poros. De la membrana citoplasmática emergen túbulos continuos con el retículo endoplasmático que se ramifican en el citoplasma. El nucléolo es central, prominente y muy denso (Vickerman, 1974). Existe un retículo endoplásmico (RE) que está disperso en el citoplasma (Duszenko y col., 1988). El aparato de Golgi (AG) está situado en el centro de la vía secretora, cuya función es la de agregar carbohidratos complejos a lípidos de membrana y proteínas sintetizadas nuevamente en el RE que serán secretadas al medio extracelular o integradas a membranas (Landfear e Ignatushchenko, 2001)

La superficie celular de los tripanosomatidos posee dos componentes asociados: la membrana plasmática, y una extensa capa de microtúbulos subpeliculares asociados a ella (Landfear e Ignatushchenko, 2001). Los microtúbulos subpeliculares son estructuras asociadas a la membrana plasmática, cuya función es evitar la absorción de nutrientes por pinocitocis a lo largo de la superficie celular (Gadelha y col., 2009); excepto en el bolsillo flagelar, la cual es la estructura donde se realizan los procesos de endocitosis y secreción que se llevan a cabo en tripanosomátideos (Landfear e Ignatushchenko, 2001).

El sistema locomotor presenta un solo flagelo, el cual se inserta en el bolsillo flagelar. El flagelo está situado en la parte anterior, otorgándole movilidad al parásito. Presenta unos pliegues de los túbulos que lo conforman y tiene una membrana ondulante que une el flagelo al cuerpo del parásito (De Souza, 2002). Además de una estructura de nueve pares de microtúbulos con disposición de anillo y un par de microtúbulos centrales libres, envueltos por una vaina flagelar conocida como axonema y junto a esta se encuentra una estructura filamentosa altamente

9

organizada que lo acompaña en toda su longitud denominada filamento paraflagelar (Bastin y col., 2000; Vaughan y Gull, 2003).

En el filamento paraflagelar y en el bolsillo flagelar se encuentran la proteína paraflagelar 2 y la clatrina, respectivamente, los cuales se desarrollan a continuación. Estas dos proteínas son importantes en la supervivencia del parásito, la primera está relacionada con el movimiento del mismo y la segunda con la formación de vesículas que permiten la entrada y salida de nutrientes (Morgan y col., 2001; Abdille y col., 2008).

1.1.4.1 Filamento paraflagelar (PFR)

El filamento paraflagelar (PFR) es una estructura filamentosa que se extiende desde el punto donde está anclado el flagelo al bolsillo flagelar y corre a lo largo de éste y del axonema de los kinetoplastideos flagelados (Bastin y col., 2000; Miranda y col., 2010). Esta estructura es detectada junto con el axonema una vez que el flagelo sale del bolsillo flagelar y se extiende hasta el extremo anterior. Está estrechamente relacionada con los dobletes 4 y 7 del axonema a través de filamentos específicos (Figura 5). La posición del flagelo en relación al cuerpo celular está definida por el PFR (McKean y col., 2003).

El PFR es una estructura compleja, trilaminar formada por tres dominios, definidos por la posición en el axonema: un dominio proximal corto, un dominio intermedio y uno distal más desarrollado (Figura 5). Los dominios proximal y distal presentan estructura similares, con varios sacos apilados entre sí paralelamente. Por otro lado, el dominio intermedio está compuesto por filamentos delgados que unen los otros dos dominios. El PFR está físicamente conectado al axonema a través de fibras con forma de letras "V", que se fijan al dominio proximal (Figura 5) (De Souza y Souto-Padrón, 1980; Maga y col., 1999; Landfear e Ignatushchenko, 2001).



Figura 5. Corte transversal del flagelo de *Trypanosoma* sp. El filamento paraflagelar (PFR) está divido en tres dominios: D: distal; I: intermedio; P: proximal. Presenta un axonema (Ax) (Modificado de Branche y col., 2006).

Inicialmente se creía que el PFR le daba un atributo físico al flagelo (Fuge, 1969). Estudios posteriores demostraron que el PFR presenta funciones metabólicas, reguladoras, de señalización y de motilidad. Por un lado, cumple una función metabólica, ya que está estrechamente relacionado con el bolsillo flagelar, el cual se encarga de controlar el metabolismo del parásito. Cumple una función reguladora, ya que controla la regulación de los genes por mecanismos posttranscripcionales y transcripción del ARN. Finalmente, cumple una función de señalización del calcio, ya que existe una interacción específica entre la calmodulina y los componentes del PFR que permiten el desplazamiento del parásito (Bastin y col., 1996; Portman y Gull, 2010).

Cuando el PFR no está correctamente estructurado, no se puede completar la citocinesis (Broadhead y col., 2006), dando lugar a células con núcleos múltiples, cinetoplastos y flagelos y, por lo tanto, no se induce la movilidad (Portman y Gull, 2010).

Se han asociado gran cantidad de proteínas al PFR a través de estudios bioquímicos, bioinformáticos e inmunológicos, aunque las funciones de éstas aún se desconocen (Woodward y col., 1994). Schlaeppi y colaboradores (1989) y Portman y Gull, 2010 demostraron que existen dos proteínas principales que forman el PFR: la proteína paraflagelar 1 (PFR1) y la proteína paraflagelar 2 (PFR2). La zona proximal del PFR está formada principalmente de filamentos compuestos de PFR1. Por lo tanto, los dominios intermedio y distal del PFR deben contener la mayor parte de la proteína PFR2 (Maga y col., 1999). La PFR1 tiene una masa molecular que varía entre 70– 80 KDa, mientras que la PFR2 varía entre 65- 72 KDa.

Proteína paraflagelar 2 (PFR2)

La PFR2 es altamente organizada y está directamente relacionada con la motilidad del parásito (Clark y col., 2005; Abdille y col., 2007). Las mutaciones nulas del gen PFR2 han evidenciado que la estructura del PFR es necesaria para la motilidad y viabilidad del parásito (Morell y col., 2005). Estas mutaciones ocasionan la producción de parásitos con baja velocidad de movimiento y graves perturbaciones en la onda del mismo (Deflorin y col., 1994; Ladon, 1996; Santrich y col., 1997; Maga y col., 1999).

En *Leishmania* sp y *Trypanosoma brucei* la masa molecular de la PFR2 corresponde a 69 KDa (Portman y Gull, 2010). El mecanismo de regulación es post-transcripcional, ocurriendo a través de corte y empalme, poliadenilación, estabilidad del ARNm, traducción y estabilidad de las proteínas (Vanhamme y Pays, 1995; Moore y col., 1996).

En vista de que no hay reportes del gen que codifica la PFR2 de *T. vivax* y que los tratamientos actuales para la tripanosomosis bovina son insuficientes y los fármacos utilizados son altamente tóxicos, el estudio de esta proteína es necesario para la búsqueda de posibles inmunógenos que sirvan para el control de la tripanosomosis (Bastin y col., 1998).

1.1.4.2 Bolsillo flagelar

A medida que transcurre el ciclo de vida del tripanosoma, el flagelo sufre una serie de cambios que dan lugar a la aparición del bolsillo flagelar, en donde ocurren los procesos pinocíticos, endocíticos y exocíticos (Absalon y col., 2008).

El bolsillo flagelar es una invaginación profunda de la membrana plasmática en la base del flagelo, que varía en tamaño de acuerdo al estadío del ciclo de vida del parásito. Esta estructura es dinámica y está asociada a los procesos de intercambio de nutrientes, proteínas, partículas, entre el interior y el exterior del parásito (Landfear e Ignatushchenko, 2001; Field y Carrington, 2009).

El bolsillo flagelar está ubicado en el extremo posterior del tripanosoma y rodeado por el desmosoma y una zona de adhesión (Figura 6A) (Landfear e Ignatushchenko, 2001). Está compuesto por microtúbulos especializados que se encuentran a lo largo de su superficie. Estos microtúbulos, se integran en la matriz y se convierten en microtúbulos subpeliculares asociados a la zona de fijación del flagelo (FAZ). Por lo tanto, estos microtúbulos definen el eje del flagelo y sus estructuras asociadas (Bastin y col., 2000).

Existe un lugar donde se ancla el flagelo al bolsillo flagelar, conocido como collar del bolsillo flagelar (Figura 6B), un cuarteto de microtúbulos integrados a los microtubulos subpeliculares que definen el eje de entrada del flagelo. Al mismo tiempo, se encuentra el collarete del bolsillo flagelar, el cual consiste en un conjunto de fibras que son localizadas fuera de la membrana del flagelo, en el lumen del bolsillo flagelar. El collarete sirve para fijar la membrana y el axonema. Además, es una estructura que posiciona el flagelo en el contexto del citoesqueleto (Landfear e Ignatushchenko, 2001; Lacomble y col., 2009).

Finalmente, se encuentra el lumen o interior del bolsillo flagelar, el cual está formado de una matriz rica en carbohidratos de composición definida y función desconocida, el cual presenta proteínas específicas que son secretadas en ese mismo espacio (Field y Carrington, 2009).



Figura 6. Esquema del bolsillo flagelar de *Trypanosoma*. A) Microscopía electrónica del bolsillo flagelar. Ax: Axonema; BB: Cuerpo basal; FPC: Collar del bolsillo flagelar; FP: Bolsillo flagelar. B) Esquema del bolsillo flagelar, observándose los proceso de endocitosis y exocitosis (Modificado de Field y Carrington, 2009).

Las funciones del bolsillo flagelar están asociadas a la captación de grandes nutrientes a través de la endocitosis mediada por un receptor, la secreción de proteínas hacia el medio extracelular y la integración de las proteínas de membrana en la superficie de la célula (Landfear e Ignatushchenko, 2001; De Souza, 2002).
Además, en el bolsillo flagelar ocurre la degradación de anticuerpos específicos contra las glicoproteínas variantes de superficie (VSG) y así mismo, ocurren los procesos de reciclaje de las mismas, contribuyendo en la defensa en contra de la respuesta del sistema inmune (Absalon y col., 2008; Field y Carrington, 2009).

1.4.1.2.1 Mecanismos de transporte

Los diferentes mecanismos de transporte permiten al parásito adquirir nutrientes y expulsar de su interior desechos del metabolismo. Por lo que, a continuación se describirán diferentes vías de transporte que ocurren en el bolsillo flagelar de los tripanosomas.

Vía endocítica

La endocitosis es un proceso en el cual las moléculas grandes y el material particulado son internalizados. Una porción de la membrana plasmática rodea al material que va a ser tomado, formándose una vacuola o vesícula, dependiendo del tamaño de la partícula (Lodish, 2005). Existen tres tipos de endocitosis: la fagocitosis, la pinocitosis y la endocitosis mediada por un receptor. En la fagocitosis, una partícula de gran tamaño se une a la superficie, conduciendo a la expansión de la membrana e incorporándola al interior del parásito a través de la formación de una vacuola. En la pinocitosis, gotas líquidas son invaginadas por la membrana plasmática e internalizadas, formando vesículas. Y finalmente, en la endocitosis mediada por receptor, los receptores proteícos se unen a un ligando particulado, ocasionando la invaginación de la membrana dando lugar a la

16

formación de una vesícula. En el proceso de endocitosis, las vesículas endocíticas son desprendidas de la membrana del bolsillo flagelar, en donde las moléculas a ser endocitadas y/o las proteínas cargadas son enviadas al compartimiento endosoma/lisosoma o son reciclados a la superficie (Coppens y col., 1987). En los tripanosomatideos, todos los eventos endocíticos, ya sea mediado por un receptor, fagocitosis o pinocitosis, se inician en la membrana del bolsillo flagelar (Landfear e Ignatushchenko, 2001).

Vía secretora

La secreción es un proceso de segregación y liberación al exterior de sustancias químicas en una célula. La sustancia secretada puede tener una cierta función, más que ser un desecho, como es el caso de la sustancia expulsada por exocitosis. Un claro ejemplo del proceso de secreción de los tripanosomatideos es el mecanismo que ocurre en el complejo de las proteínas variantes de superficie (VSG) -Inmunoglobulinas (Ig). El complejo VSG-Ig entra al bolsillo flagelar asociado al plasma de la membrana. Los anticuerpos específicos de las VSG presentes en el interior del parásito, se encargan de la degradación y reciclaje de las mismas, contribuyendo así, con la defensa en contra de la respuesta inmune adaptativa del hospedador. A causa de esto, las VSG se reciclan eficazmente a la superficie y las Ig son degradadas (Field y Carrington, 2009). Este proceso de reciclaje o liberación de partículas implica la fusión de vesículas, que contienen la

sustancia a secretar, con la membrana citoplasmática de la célula, liberándose así el contenido de la vesícula al exterior de la célula (Landfear e Ignatushchenko, 2001).

En el proceso de secreción de los tripanosomas, participan diversos organelos del parásito, los cuales están asociados al bolsillo flagelar. En concreto, las membranas del RE se encuentran unidas al bolsillo flagelar, al igual que el AG (Lacomble y col., 2009).

En la vía secretora, las proteínas de membrana son exportadas desde el RE hacia el bolsillo flagelar. Desde el bolsillo, la superficie de proteínas de la cubierta y algunas glicoproteínas invariables de superficie (ISG) están en continuo movimiento en su superficie y cubren el cuerpo del parásito, mientras que los receptores para la absorción de macromoléculas están exclusivamente retenidos en el bolsillo flagelar (Borst y Fairlamb, 1998; Morgan y col., 2002).

Estudios realizados por Field y Carrington (2009), aseguran la presencia de VSG, en el RE, AG y en el transporte de vesículas. Sugiriendo que el paso de las VSG, ocurre a través del bolsillo flagelar y de la superficie de la célula.

1.1.4.2.2 Proteínas del bolsillo flagelar

En el proceso de transporte de nutrientes en el bolsillo flagelar están implicadas diversas proteínas, tales como el receptor Haptoglobina-Hemoglobina (HPHBR), la clatrina (CLH), una proteína de membrana rica en cisteína (CRAM), el receptor de transferrina (TFR), receptor de Lipoproteínas de alta densidad (HDLr), vesículas de transporte interno como rab11, rab5, entre otras (Landfear e Ignatushchenko, 2001). Entre estas proteínas, la clatrina, una proteína estructural del bolsillo, que está estrechamente relacionada con el proceso de endocitosis de los tripanosomas.

Clatrina (CLH)

La Clatrina (CLH) es una proteína estructural oligomérica que recubre las vesículas en el proceso de transporte trans-membrana, y está asociada en la incorporación de nutrientes al interior del parásito. Tiene una masa molecular de 191.231 kDa y 5100 pb. Su estructura consiste en tres dominios, constituidos por tres cadenas pesadas y tres cadenas ligeras; ensamblándose en una unidad conocida como trisquelion (Figura 7A). La cadena pesada está compuesta por un dominio globular N-terminal, un segmento del dominio distal, un segmento proximal, y un C-terminal, los cuales permiten la interacción con proteínas endocíticas en el bolsillo flagelar de los tripanosomas. Del mismo modo, las cadenas ligeras, se encuentran unidas al dominio proximal de las cadenas pesadas, regulando así el ensamblaje de los trisqueliones (Wakeham y col., 2003; Mousavi y col., 2004).

En el ensamblaje de esta proteína cada lado es poligonal, compuesto por dos segmentos de dominio proximal y distal anti-paralelos, formado por cuatro trisqueliones superpuestos (Figura 7B). Los trisqueliones unidos a la membrana, conforman una caja poliédrica que ocasiona la invaginación de la misma, que será regulada por las cadenas de CLH (Correa y col., 2007).



Figura 7. Estructura de la clatrina. **A.** Representación de un trisquelión, se observa las cadenas pesadas y las cadenas ligeras de la proteína. **B**. Interacción de los triqueliones. (Modificado de Mousavi y col., 2004).

Morgan y colaboradores (2001) demostraron que la CLH se localiza en el bolsillo flagelar y está asociada a la red trans-Golgi. La localización subcelular de CLH sugiere que se han conservado las funciones, mediando la endocitosis y el transporte desde la red trans-Golgi al endosoma y lisosoma en tripanosomas (Hung y col., 2004).

El tráfico vesicular mediado por CLH, es un mecanismo muy importante dentro del bolsillo flagelar, en el cual las proteínas y los lípidos son transportados desde la membrana del bolsillo hacia los organelos del tripanosoma (endocitosis) (Kirchhausen, 2000; Owen y Luzio, 2000) y hacia las vacuolas y lisosomas (Hirst y Robinson, 1998). Durante la formación de vesículas, la CLH interactúa de forma coordinada con otras proteínas de la vesícula en formación, tales como proteínas adaptadoras (AP), y selectivamente recluta moléculas de carga específicas en vesículas e interviene otras moléculas como AP180, auxilina, epsin15 y epsin, que tienen funciones regulatorias (Figura 8) (Kirchhausen, 1999; Mousavi y col., 2004).



Figura 8. Endocitosis mediada por clatrina. (Modificado de Mousavi y col., 2004).

Otro papel que cumple la CLH, es la regulación de las funciones celulares y la conducción de los altos niveles de actividad endocítica en el estadio en sangre del parásito (Morgan y col., 2001; Allen y col., 2003). Los niveles de expresión de la cadena pesada de la CLH se correlacionan con la actividad endocítica y de reciclaje, esencial para la supervivencia del parásito en el estadío en sangre (Morgan y col., 2001; Hung y col., 2004).

La proteína CLH tiene una masa molecular de 191.231 kDa y el gen tiene una longitud de 5100 pb. Al ser una proteína de gran tamaño se seleccionó una secuencia parcial del gen de 535 pb, correspondiente al dominio N-terminal de la proteína (Figura 9). Esta secuencia parcial se seleccionó debido a que es una región importante en la formación de la vesícula y unión de los trisqueliones (Hung y col., 2004; Pierre y col., 2011; Willox y Royle, 2011). Y además se presume que es una región antigénica.



Figura 9. Secuencia aminoacídica de la CLH. El segmento amplificado representa la secuencia parcial de la CLH que se va a identificar en este trabajo. (Modificado de Xing y col., 2010).

2. ANTECEDENTES

2.1 Proteínas paraflagelares (PFR1-PFR2).

El PFR fue identificado en tripanosomas por primera vez por Keith Vickerman en 1962, el cual observó que éste está compuesto por filamentos finamente organizados.

Schlaeppi y colaboradores, en 1989, demostraron que el PFR de *T. brucei* estaba compuesto de dos proteínas principales, la PFR1 y la PFR2, cuyos pesos moleculares correspondían a 69 kDa y 73 kDa, respectivamente. Estudios bioquímicos realizados por estos investigadores demostraron a su vez, que las proteínas del PFR no formaban parte de las proteínas del citoesqueleto, concluyendo que estas dos proteínas representan dos configuraciones diferentes de un polipéptido individual codificado por un locus del PFR.

Santrich y colaboradores, en 1997, demostraron el papel que cumple el PFR en *L. mexicana*. Estos investigadores mutaron el gen que codifica la PFR2 de *L.mexicana* y demostraron que el mutante revelaba la presencia de una subestructura, que contenía la proteína PFR1, indicando que ésta puede polimerizar en ausencia de PFR2. La presencia de esta mutación ocasionaba cambios flagelares y disminución de la velocidad de movimiento al compararlos con los parásitos silvestres.

Maga y colaboradores, en 1999, demostraron la presencia de las dos proteínas (PFR1 y PFR2) que conforman el filamento paraflagelar en *L. mexicana*.

23

Estos investigadores, hicieron una mutación nula a la PFR2, teniendo como resultado que el parásito perdía la motilidad. También compararon mutantes nulos de la PFR2 con mutantes nulos de la PFR1, obteniendo que ambas proteínas son esenciales en la formación y movilidad del parásito. Por lo que concluyeron que, para la formación del filamento paraflagelar, ambas proteínas son esenciales.

Clark y colaboradores, en el 2005, clonaron y expresaron dos genes que se encuentran presentes en el PFR de *Trypanosoma cruzi*. Estas proteínas fueron purificadas y demostraron ser inmunogénicas, dándoles protección contra la infección.

Abdille y colaboradores (2008a), estudiaron la similaridad que existe entre la PFR1 y la PFR2 en *T. evansi*, mediante técnicas de biología molecular, Western Blot y ensayos de inmunoprecipitación. La secuencia aminoacídica correspondiente a la PFR1 expresada demostró una identidad del 68,4% con la proteína PFR2 de *T. evansi*. Por otro lado, mostraron que los anticuerpos preparados contra PFR1 y PFR2 en ratones reconocen a estas proteínas sin reactividad cruzada.

Abdille y colaboradores (2008b), establecieron la existencia del gen que codifica la PFR2 en *T. evansi*, el cual clonaron y expresaron en bacterias. Demostraron al mismo tiempo por cromatografía de afinidad y Western blot, que la proteína paraflagelar PFR2 es conservada en diversos parásitos, por lo que puede servir como blanco para el desarrollo de vacunas en diferentes especies de *Trypanosoma*.

Según Miranda y colaboradores, en el 2010, el PFR es una estructura específica y única en la familia de los Kinetoplastidae. Estos investigadores obtuvieron por microscopia de fuerza atómica y de transmisión la estructura del PFR de *T. cruzi*, demostrando que es una estructura estática y que la organización de los filamentos difiere entre las diversas regiones del flagelo. Al mismo tiempo demostraron que un silenciamiento de la síntesis de las principales proteínas (PFR1 y PFR2) afecta en la motilidad del flagelo.

Un trabajo reciente de Portman y Gull (2010), estableció el papel del flagelo y de sus componentes en la motilidad celular. Estos autores estudiaron las características morfológicas de la estructura de los filamentos paraflagelares (PFR) de los kinetoplastideos, concluyendo que el PFR es una plataforma metabólica, homeostática, regulatoria y sensorial que puede ser conservada en la evolución y que la PFR1 y la PFR2 son proteínas esenciales en la formación del PFR.

2.2 Clatrina (CLH)

Morgan y colaboradores, en el 2001, indican la presencia de la CLH, actuando como transportadora de un cierto número de moléculas en el bolsillo flagelar. Estos investigadores clonaron y caracterizaron la cadena pesada de la CLH e hicieron comparaciones de los diferentes estadios de *T.brucei*. Por otro lado, estos autores demostraron por microscopía electrónica que la CLH está distribuida en la región posterior del parásito (bolsillo flagelar) y observaron que la adquisición de nutrientes por endocitosis es requerida en el estadío procíclico. Wakeham y colaboradores, en el 2003, describen la estructura de la CLH, "el trisquelión" en los tripanosomatideos. Estos investigadores se enfocaron en el autoensamblaje de la CLH, el cual implica interacciones débiles coordinadas que favorecen la regulación celular. Así mismo, estudiaron la dimerización de las clatrinas recombinantes de los dominios proximales y distales, demostrando que las interacciones entre las diferentes recombinantes dependen de los procesos de polimerización de la CLH en la formación de las vesículas.

En el mismo año, Allen y colaboradores (2003), estudiaron la endocitosis mediada por la CLH de *T. brucei*. Estos autores correlacionaron la actividad endocítica con los niveles de expresión de la cadena pesada de la CLH. Los resultados sugirieron que la endocitosis rápida juega un papel muy importante en la evasión de la respuesta inmune. En este estudio se evaluó el papel de la CLH mediante el ARN de interferencia (ARNi) y observaron que al suprimir la expresión de la CLH ocurre una muerte rápida en el estadío en sangre de los tripanosomas. Por otro lado, en el estadío procíclico, observaron una acumulación de vesículas y alteraciones en el tráfico de una proteína lisosomal, indicando variaciones en la función de la CLH en este estadío del ciclo de vida de *T. brucei*.

Mousavi y colaboradores, en el 2004, analizaron la endocitosis dependiente de CLH en los tripanosomatideos. Estos investigadores demostraron que una proteína adaptadora (AP-2) está implicada en casi todas las etapas de la formación de las vesículas con recubrimiento de CLH. Estos estudios explican que, la

26

fosforilación de las proteínas adaptadoras, así como del receptor, son muy importantes para la captación de los receptores de señalización.

En el 2004, Hung y colaboradores, determinaron que el bolsillo flagelar representa el 0,43% de la membrana; y las moléculas receptoras como la CLH, son retenidas en este espacio. Estos autores, estudiaron la función de la cadena pesada de la CLH en el tráfico de receptores en el bolsillo flagelar de *T.brucei*, mediante el enfoque de doble cadena de ARN. Los resultados obtenidos de la inducción por ARNi a las 24h, indicaron que en el estadío procíclico disminuyó la absorción de macromoléculas por medio de la endocitosis mediada por el receptor. A las 48h, no se observó exportación de una proteína de membrana rica en cisteína (CRAM). Finalmente, a las 72h, se observaron cambios morfológicos en la membrana del tripanosoma, en donde no se encontró diferencia estructural entre el bolsillo flagelar y el flagelo. Los autores concluyeron que el tráfico de proteínas dependiente de la CLH en el bolsillo flagelar, puede ser esencial para la biogénesis y el mantenimiento del bolsillo en los tripanosomas.

En el 2004, Overath y Englester, estudiaron el funcionamiento del bolsillo flagelar y los procesos que ocurren en *T. brucei*. Estos investigadores realizaron estudios con el ARN de interferencia y técnicas de microscopía electrónica, demostraron que existe un tráfico de proteínas mediado por CLH, mediante el cual ocurren procesos de reciclaje e incorporación de nutrientes.

27

Estudios recientes de Kumar y colaboradores (2011), resaltaron la importancia del reciclaje de moléculas de actividad endocítica en la infección de ratones con *T. brucei brucei*. Estos investigadores diseñaron diversas estrategias para poder analizar la vía endocítica en el bolsillo flagelar. Los resultados obtenidos indican que la vía endocítica está implicada en la evasión inmune por la prestación de un mecanismo para remover las inmunoglobulinas de superficie reconocidas por las VSG, concluyendo que la CLH representan un excelente blanco para las drogas.

Stijlemans y colaboradores, en el 2011, estudiaron los mecanismos de evasión de la respuesta inmune de *T. brucei*. Estos investigadores diseñaron nanoanticuerpos VSG-específicos (Nb), de bajo peso molecular, derivados de la cadena pesada de anticuerpos de los camélidos que impiden la endocitosis. El bloqueo de la endocitosis mediada por la CLH ocasionó perturbaciones metabólicas, relacionadas con la reducción de los niveles ATP intracelular y pérdida del potencial de membrana, culminando en la muerte celular del parásito.

Objetivo general:

✓ Identificar y clonar el gen que codifica la proteína paraflagelar 2 y una secuencia parcial de la región N-terminal de la clatrina de *Trypanosoma vivax*.

Objetivos específicos:

1. Obtener ADN de *Trypanosoma vivax*, TvLIEM176, a partir de la infección de un ovino sano.

 Diseñar cebadores específicos para la amplificación del gen que codifica la PRF2 y la secuencia parcial de la región N-terminal de la CLH.

 Amplificar los genes que codifican la PRF2 y la secuencia parcial de la región N-terminal de la CLH.

4. Clonar los genes que codifican la PFR2 y una secuencia parcial de la región Nterminal de la CLH en un sistema bacteriano.

5. Comparar las secuencias de los genes que codifican la PFR2 y la secuencia parcial de la región N-terminal de la CLH de *T. vivax* con las secuencias putativas obtenidas por bioinformática.

Esquema de la metodología general empleada para la identificacion y clonación de las proteínas.

• Obtención de ADN del *T. vivax*.

•Amplificación por PCR del gen que codifica la PFR2 y la secuencia parcial de la región N-terminal de la CLH.

• Purificación del producto de PCR de cada gen.

•Construcción de los vectores de clonación pGEMT-TvPFR2 y pGEMT-TvnCLH.

•Transformación de bacterias E. coli TOP10 mediante electroporación.

•Crecimiento de los clones en medio selectivo LB+Amp+IPTG+X-Gal.

•Selección de las colonias recombinantes.

•Extracción del ADN plasmídico por el método de Cloruro de litio.

•Corte con enzimas de restricción del ADN plasmídico.

•Secuenciación de los genes TvPFR2 y TvnCLH.

•Análisis bioinformáticos.

•Comparación de las secuencias.

4.1 Obtención de ADN de *T. vivax*, TvLIEM176, a partir de la infección de un ovejo sano.

4.1.1 Grupo experimental.

A un ovejo sano de 6 meses, de raza West African, de 16 Kg se le tomó una muestra de sangre con el fin de evaluarlo parasitológicamente y descartar la presencia de hemoparásitos.

El ovino permaneció en el bioterio del Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos (IDECYT), en donde contó con las condiciones adecuadas para su mantenimiento y posterior tratamiento. Se le suministró agua *ad libitum* y se alimentó con pasto seco.

Por otro lado, en relación al tratamiento post-infección, se le suministró una dosis de 0,5mg/Kg de Cloruro de Isometamidium y 5mL de Hematofos (suplemento vitamínico), con el fin de garantizar su supervivencia (Sandoval y col., 1995; Espinoza y col., 1996).

4.1.2 Características del aislado.

El aislado de *T. vivax* utilizado para la infección del ovejo, es procedente del estado Trujillo, su denominación es TvLIEM176. Este aislado se encuentra criopreservado en tanques de nitrógeno líquido en el Laboratorio de Biología Molecular del IDECYT.

4.1.3 Infección experimental.

El ovejo fue inmunosuprimido con cinco inyecciones intravenosas de 2 mg/Kg de dexametasona, suministrada interdiariamente. A la cuarta dosis de haber iniciado la inmunosupresión, se inoculó 1 mL de un aislado venezolano de *T. vivax* (TvLIEM176) administrado por vía intravenosa (González y col., 2005; Goméz, 2011).

El seguimiento de la infección se hizo a través de la obtención de muestras de sangre interdiariamente, a partir de la vena yugular, con el uso de tubos tipo Vacutainer[®] en presencia de EDTA, durante la primera semana de post-infección, hasta alcanzar el pico de parasitemia (aproximadamente 20 parásitos por campo~ 1 x 10⁷ parásitos/mL). Se tomaron las respectivas alícuotas, las cuales se utilizaron para la evaluación parasitológica por el método de Brener y para la purificación de *T. vivax*.

4.1.4 Evaluación parasitológica.

La parasitemia fue evaluada según el método de Brener. Este método consiste en la toma de 5 μ L de sangre colocada en una lámina portaobjeto, cubriéndose con una lámina cubreobjetos de 22 x 22 mm, extendiéndose la sangre de manera uniforme en toda el área de la lámina cubreobjetos. Posteriormente, se contaron los parásitos presentes en 100 campos, en un microscopio óptico Leica[®] a un aumento de 40X, en donde la parasitemia se expresó en tripanosomas/mL de sangre según la siguiente fórmula:

$$\frac{Tripanosomas}{mL} = Tc \ x \ Fm \ x \ Fc$$

Donde:

Tc: Tripanosomas contados en 100 campos.

Fm: Factor del microscopio. Para este caso particular Fm: 5824. El factor del microscopio está relacionado con el área de visión y el número de campos observados al microscopio a un aumento determinado de los oculares y el objetivo.

Fc: Factor de corrección (1000/5 µL: 200).

4.1.5 Purificación de un aislado venezolano de T. vivax.

Una vez alcanzado el pico de parasitemia (10^7 Try/mL) , se procedió a la purificación de los parásitos de acuerdo al protocolo descrito por González y colaboradores (2005). Inicialmente se realizó un gradiente de Percoll para separar los glóbulos rojos y luego se pasó por una cromatografía en columna de DEAE celulosa, con el fin de separar el resto del material sanguíneo por su carga.

Se tomaron 90 mL de sangre del ovino infectado correspondiente al primer pico de parasitemia, añadiéndose la misma en tubos de EDTA-Na₂ al 0,15%; se mezcló v/v delicadamente con una solución de Percoll Sigma[®] (8,55% de sacarosa, 2,0% de glucosa, se ajustó el pH a 7,5 con HEPES sólido) (Grab y Bwayo, 1982). La mezcla se centrifugó a 17500 *xg* por 25 min a 15° C, obteniéndose tres capas claramente diferenciadas. Se recolectó la capa superior del gradiente formado, rica en parásitos, con la ayuda de pipetas Pasteur. La capa superior se diluyó en una solución tampón glucosado (PBSG) (fosfato sódico 40mM, pH 7,5, NaCl 150mM, glucosa 1%). A continuación, se centrifugó a 6000 xg por 15 min a 15° C. El sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió con solución PBSG. Este procedimiento se realizó por duplicado, de modo de lavar el sedimento con PBSG, y así eliminar los residuos de Percoll. El sedimento se resuspendió con 2mL de PBSG y se colocó en una columna cromatográfica de intercambio iónico de DEAE celulosa, equilibrada previamente con PBSG. Constantemente, el eluato se revisó en un microscopio para confirmar la elución y la pureza de los tripanosomas. Posteriormente, se recolectaron los tubos que contenían parásitos en un pool, y se centrifugaron a 6000 xg por 15 min a 15° C. Luego de la centrifugación, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el sedimento en 1 mL de PBS y se transfirió a un tubo Eppendorf. El concentrado de parásitos se centrifugó a 14000 xg por 15 min, se descartó el sobrenadante y se guardó el sedimento a -20° C. (Brener, 1979; González y col., 2005).

4.1.6 Extracción de ADN genómico a partir de T. vivax purificado.

Una vez obtenidos los parásitos purificados, se procedió a la obtención del ADN genómico de *T. vivax*. El protocolo utilizado fue el descrito por el estuche comercial Promega (Wizard[®] Genomic ADN Purification kit A1120).

Inicialmente, se tomaron 300 μ L del ADN purificado del parásito y se agregaron 900 μ L de la solución de lisis celular en un tubo de centrífuga de 1,5 mL. A continuación, se mezcló por inversión para ocasionar la ruptura de los glóbulos rojos y glóbulos blancos que quedasen de la purificación del parásito. La mezcla se incubó por 10 min a temperatura ambiente, realizando inversión al tubo periódicamente. Posteriormente, se centrifugó por 20 seg a 16000 xg. Del producto obtenido, se descartó el sobrenadante, en el cual se encontraron organelos y restos de membrana celular. El sedimento fue removido en un agitador para resuspender el contenido del mismo en la solución de lisis celular. A continuación, se añadieron 300 µL de la solución de lisis nuclear para la obtención del ADN, en donde se mezcló por inversión hasta formar una solución viscosa. Dicha mezcla se incubó por 30 min a TA, con el fin de garantizar la ruptura de los núcleos presentes. Luego, se agregaron 1,5 µL de RNAsas, y se mezcló suavemente por inversión. La mezcla obtenida, se incubó 15 min a 37° C y posteriormente 5 min a TA, para eliminar la mayor cantidad de ARN. Posteriormente, se añadieron 100 µL de la solución de precipitación de proteínas a la mezcla y se agitó en el vórtex por 20 seg o hasta que se observaron pequeños agregados de proteínas. Una vez obtenido el agregado, se centrifugó por 3 min a 16000 xg. Transcurrido este tiempo, se observó un sedimento color marrón, el cual fue descartado y hubo una recuperación del sobrenadante, que contenía el material genético. Se trasvasó a otro tubo de centrifuga de 1,5 mL, el cual contenía 300 µL de isopropanol. Se mezcló por inversión hasta que se observaron los hilos de ADN. Luego se centrifugó por 5 min a 16000 xg, descartándose el sobrenadante y se obtuvo un sedimento de color blanco en el fondo del tubo de centrifuga. Adicionalmente, se añadieron 300 μ L de etanol al 70% para lavar el sedimento, se centrifugó durante 1 min a 16000 xg y se descartó el sobrenadante. El sedimento se secó al vacío, en un equipo conocido como concentrador centriVap ADN LABCONCO, a 65° C durante 10 min, con el

35

fin de evaporar el etanol de la muestra. Finalmente, se agregaron 100 μ L de agua bidestilada para rehidratar el sedimento, y se colocó a 4º C por 12 horas.

Para comprobar la integridad del ADN genómico de *T. vivax*, se realizó una corrida electroforética en un gel de agarosa al 0.8%, en una solución de buffer TAE 1X (20 mL TAE 50X, 980 mL H₂O), el cual contenía 1 μ L de SYBR[®] Safe ADN gel stain (Invitrogen) por cada 10 mL de TAE. La corrida electroforética se realizó a 100 V durante 30 min. Una vez transcurrido el tiempo de corrida, se observó cada gel en un equipo de fotodocumentación (Uviti).

4.2 Diseño de cebadores para la amplificación del gen que codifica la TvPFR2 y la Tv_nCLH.

Previo al diseño de cebadores se realizó una búsqueda bioinformática que permitió seleccionar la secuencia putativa del gen que codifica la PFR2 de *T. vivax* (TvPFR2), así como la secuencia parcial de la región N-terminal de la CLH de *T. vivax* (Tv_nCLH). Estas secuencias sirvieron de base para el diseño de los cebadores que amplificaron el TvPFR2 y la Tv_nCLH en toda su extensión.

4.2.1 Obtención de la secuencia de los genes que codifican la TvPFR2 y la Tv_nCLH.

Las secuencias de los genes que codifican la PFR2 y la secuencia parcial de la CLH de *T*. vivax se obtuvieron mediante el uso de herramientas bioinformáticas. Se utilizaron bases de datos como GeneDB (http://www.genedb.org), Tritryp (http://tritrypdb.org/tritrypdb/), o GenBank que permitieron obtener las secuencias putativas de cada gen de *T. vivax* TvY486, las cuales sirvieron de base para la obtención de la secuencia adecuada. El Instituto Wellcome Trust Sanger ha llevado a cabo el genoma parcial de *T. vivax* cepa Y486, produciendo una secuencia preliminar del genoma de alta calidad.

4.2.2 Diseño de cebadores del gen que codifican la TvPFR2 y la Tv_nCLH .

Con el fin de identificar y amplificar los genes que codifican para la secuencia parcial de la CLH y la PFR2 de TvLIEM176, se diseñaron cebadores para su amplificación. Para ello, se utilizó el programa OLIGO-EXPLORER (http://www.genelink.com/tools/gl-oe.asp), el cual herramienta es una bioinformática que permite diseñar los cebadores, considerando propiedades tales como, la temperatura de fusión (Tm, por sus siglas en inglés), el porcentaje guanina-citosina (%GC), posibilidad de formación de horquillas o dímeros de cebadores. A su vez, los cebadores permiten la amplificación en dirección al crecimiento de la cadena 5' \rightarrow 3'. Los cebadores diseñados para la amplificación de la PFR2 se denominaron TvPFRF/R y para la secuencia parcial de la CLH se denominaron Tv_nCLHF/R.

4.3 Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para la estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen que codifica la PFR2 y la secuencia parcial de la CLH, se debieron establecer las características del ciclado, es decir, el tiempo y temperatura de hibridación. La fase correspondiente a la hibridación se sometió a gradientes de temperatura, con el fin de optimizar la reacción.

En relación a la mezcla de reacción, se estandarizó con las cantidades adecuadas de Buffer, MgCl₂, dNTPs, cebadores, Taq, ADN y agua, para la amplificación de cada gen.

Una vez estandarizada la técnica, se evaluó cada producto de PCR en geles de agarosa a concentraciones apropiadas de acuerdo a los tamaños de los productos de PCR obtenidos, en una solución de buffer TAE 1X, el cual contenía 1 μ L de SYBR[®] Safe TM ADN gel stain (Invitrogen) por cada 10 mL de TAE. La corrida electroforética se realizó a 100 V durante 30 min. Una vez transcurrido el tiempo de corrida, se observó cada gel en un equipo de fotodocumentación (Uviti).

4.3.1 Purificación del producto de PCR.

Una vez obtenido el amplificado de cada gen, se procedió a la purificación de los productos de PCR. El protocolo realizado fue el descrito en el estuche comercial Wizard[®] SV Gel and PCR de Promega, cuyo fundamento corresponde a la centrifugación del producto de PCR en minicolumnas de afinidad al ADN.

Inicialmente, se amplificó cada gen de acuerdo a las condiciones estandarizadas, la banda obtenida de la corrida electroforética se cortó en el gel de agarosa y se colocó en un Eppendorf previamente pesado. Posteriormente, se pesó el tubo con la banda, la cual dio la relación para agregar la solución de unión a la membrana (10 μ L de solución de unión a la membrana x 10 mg de gel de agarosa).

Luego, la mezcla se sometió a vórtex y se incubó a 50- 65° C durante 10 min o hasta que la banda estuvo disuelta.

La solución formada se transfirió a una minicolumna S.V colocada en un tubo de colección (para cada producto PCR). Se centrifugó la minicolumna ensamblada a 16000 xg por 1 min. Se removió la minicolumna S.V, se descartó el líquido del tubo de colección y se colocó nuevamente la minicolumna SV en el tubo de colección. Luego se lavó la minicolumna S.V añadiendo 700 µL de "Membrana Wash Solution" previamente diluída en etanol 95%. Se centrifugó la minicolumna S.V ensamblada por 1 min a 16000 xg. Se vació el tubo colector y se colocó nuevamente la minicolumna dentro de él. Se repitió el lavado con 500 µL de "Membrane Wash Solution" y se centrifugó la minicolumna ensamblada por 5 min a 16000 xg. A continuación se removió la minicolumna ensamblada de la centrífuga teniendo cuidado de que el contenido del tubo colector no tocara la membrana. Se vació el tubo colector y se colocó nuevamente la minicolumna, ambos se colocaron en un concentrador (LABCONCO) 5 min a 65° C, para permitir la evaporación de residuos de etanol. Finalmente, se transfirió la minicolumna S.V a un tubo de 1,5 mL estéril y se agregaron 50 µL de agua libre de nucleasas directamente al centro de la columna sin tocar la membrana con la punta de la pipeta. Se incubó a temperatura ambiente por 1 min. Se centrifugó por 1 min a 16000 xg; se descartó la minicolumna S.V y se mantuvo el Eppendorf con el ADN diluído a -20º C.

4.3.2 Secuenciación del producto de PCR.

Con el fin de determinar el gen que codifica la PFR2 y la secuencia parcial de la CLH de *T. vivax*, se realizó la secuenciación automática.

Una vez obtenido el producto purificado de PCR, se colocaron alícuotas de 15 μ L del mismo (\approx [20 ng]) y 5 μ L de los cebadores (\approx [5 pmoles/ μ L]) (sentido y antisentido) y se llevaron a la Unidad de Estudios Genéticos y Forenses (UEGF) ubicada en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), con el objetivo de secuenciar el fragmento deseado mediante la secuenciación automática del ADN.

4.3.2.1 Análisis de las secuencias.

Una vez obtenida la secuencia de cada gen, se realizó un análisis *in sílico* para determinar la identidad y/o diferencias con las secuencias putativas obtenidas por bioinformática. Inicialmente, las secuencias obtenidas se colocaron en la base de datos del servidor National of Biotechnology Information, mediante el uso del programa BLAST, para encontrar el alineamiento con otros organismos. Al mismo tiempo, se empleó el software DNACLUB que permitió el análisis del ADN, encontrar los marcos abiertos de lectura (ORF) y traducir la secuencia de la proteína. A su vez, se utilizó el programa BIOEDIT para obtener una secuencia consenso de cada gen, una vez obtenido la secuencia del TvPFR2 y la Tv_nCLH por secuenciación automática. Por otro lado, se utilizó el programa Multialin (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/) que permitió conocer la homología entre

40

las secuencias putativas reportadas para diferentes tripanosomatídeos y las obtenidas por secuenciación.

4.3.3 Confirmación de la secuencia por corte con enzimas de restricción del producto de PCR.

Paralelo al envió del producto purificado de la PCR a la UEGF, se obtuvieron los mapas de restricción del gen que codifica la PFR2 y la secuencia parcial de la CLH, mediante el uso del programa NEBcutter (http://tools.neb.com/NEBcutter2/). El objetivo de realizar estos mapas fue poder predecir los sitios de corte del producto de PCR de cada gen y escoger la enzima para hacer el corte que arrojara un número manejable de fragmentos de restricción.

Así, luego de obtener los mapas de restricción, se procedió a la digestión con las enzimas de restricción. Para ello, una alícuota del producto de PCR purificado de cada amplificación, fue añadido a la mezcla con Buffer específico de la enzima, la enzima de restricción, el ADN y el agua desionizada. Luego, se colocó cada reacción en el concentrador centriVap ADN LABCONCO a 37° C durante el tiempo correspondiente al que tardó cada enzima en cortar. Posteriormente, la digestión se observó en geles de agarosa a concentraciones apropiadas de acuerdo a los tamaños de los productos y por medio de un equipo de fotodocumentación (Uviti), esperándose los fragmentos que confirmaron la presencia de cada gen amplificado. En la tabla 1 se observan los componentes de la mezcla de reacción para la digestión del producto de PCR purificado del gen que codifica la PFR2 con la enzima *Eco*RV, el cual tuvo 2 horas de incubación.

Tabla 1. Componentes de la mezcla usada para realizar el corte con la enzima de
restricción <i>Eco</i> RV del producto de PCR del gen que codifica la PFR2.

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN (µL)
Buffer D	10X	2
BSA	10mg/mL	0,2
Enzima (EcoRV)	10U/µL	1
ADN	~40ng/µL	4
Agua desionizada	-	12,8
Volumen total		20

En la tabla 2, se observan los componentes de la mezcla de reacción para la digestión del producto de PCR de la secuencia parcial de la CLH con la enzima *Kpn*I. La mezcla de reacción fue incubada por 2 horas.

Tabla 2. Componentes de la mezcla usada para realizar el corte con la enzima de restricción *Kpn*I del producto de PCR de la secuencia parcial de la CLH.

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN (µL)
Buffer J	10X	2
BSA	10mg/mL	0,2
Enzima (KpnI)	12U/µL	1
ADN	~40ng/µL	4
Agua desionizada	-	12,8
Volumen total		20

Para confirmar la presencia del gen TvPFR2 y de la Tv_nCLH se realizaron tres metodologías que permitieron verificar la identificación de los genes: 1) Amplificación por PCR y observación del producto en geles de agarosa; 2) Secuenciación del producto purificado de la PCR en la UEGF y 3) Cortes con enzimas de restricción del producto purificado de la PCR.

4.4 Obtención de los clones pGEMT/TvPFR2 y pGEMT/Tv_nCLH.

El objetivo de esta clonación fue la producción de un gran número de copias con alta fidelidad del gen que codifica la PFR2 y la secuencia parcial de la CLH. Para ello, el gen o la secuencia parcial se insertó en el vector de clonación pGEM-T, formando una molécula de ADN recombinante y esta última, se incorporó a la célula anfitriona *E. coli* TOP10 donde tuvo lugar la amplificación por replicación del vector recombinante.

4.4.1 Preparación de las células electrocompetentes de *E. coli* TOP10.

Para preparar las células electrocompetentes, se partió de un cultivo incubado toda la noche (ON) de 3 mL de LB + 200 μ L de *E. coli* TOP10, las cuales estaban criopreservadas en el tanque de nitrógeno del Laboratorio de Biología Molecular del IDECYT. El cultivo se dejó en agitación a 37° C, durante toda la noche. Al día siguiente, se pasaron los 3 mL del cultivo a una fiola con 200 mL de LB (Bacto-tryptona, extracto de levadura, NaCl, pH 7), en condiciones de esterilidad. Este cultivo se incubó a 37° C y en agitación, hasta alcanzar una D. O_{600 nm} = 0.6. Es importante destacar, que como blanco en la medición de la densidad óptica, se usó medio LB. A continuación, se distribuyeron los 200 mL de cultivo en 4 tubos de 50 mL. Se centrifugaron a 4000 *xg* a 4° C durante 15 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 45 mL de H₂0 estéril y fría (los tubos se sometieron a vórtex). Nuevamente, se centrifugaron con las condiciones antes mencionadas, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron con 20 mL de H₂O,

se trasvasó lo obtenido en un único tubo. Se centrifugó a 4000 xg a 4° C por 15 min, se descartó el sobrenadante, se tomó un tubo de 15 mL y se resuspendió en 4 mL de glicerol al 10%. Se centrifugó nuevamente a 4000 xg a 4° C por 15 min, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 300 µL de glicerol al 10%. Finalmente, las células se pudieron usar directamente para transformación o se dispensaron en alícuotas de 40 µL en -80° C. Se tomó como control de transformación una placa LB, que permitió el crecimiento de la *E. coli* TOP10 y una placa LB/Amp. Las células *E. coli* TOP10 son sensibles a la ampicilina, por lo que no debió encontrarse crecimiento alguno.

4.4.2 Reacción de ligación para la formación de los vectores pGEMT/TvPFR2 y pGEMT/Tv_nCLH.

La ligación se realizó entre el inserto y el vector pGEM-T easy para formar los vectores pGEMT/PFR2 y pGEMT/_nCLH. El protocolo utilizado fue el descrito por la casa comercial Kit de pGEM-T easy (Promega).

Se realizó la mezcla de reacción de ligación como se observa en la tabla 3 (manteniendo previamente los tubos Eppendorf en hielo).

Tabla 3. Reactivos usado en la ligación entre el vector pGEMT y el producto purificado de PCR del TvPFR2 y de la Tv_nCLH.

Reactivos	CONCENTRACIÓN	Volumen (µL)
Buffer 2X rapid ligation	10X	2
Buffer T4 ADN ligasa		
Vector pGEM-T easy	50 ng/μL	0,5
Producto de PCR	~40ng/µL	2
T4 ADN ligasa	3U/µL	1
H ₂ O estéril	-	5,5
Volumen final		10

La mezcla de ligación se incubó toda la noche a 4° C sin agitación.

4.4.3 Transformación.

La transformación consiste en la inserción del vector recombinante dentro de la célula competente *E. coli* TOP10 (Luque y Herráez, 2008). El protocolo que se empleó fue el siguiente:

Previo a la transformación se prepararon placas de LB y de LB/ampicilina/IPTG/X-gal. Dos placas por reacción de ligación.

Una vez obtenidas las células electrocompetentes, se procedió a realizar la electroporación, en la cual, se colocaron las cubetas para electroporar en hielo, al igual que las células, para no perder la cadena de frío. Posteriormente, se tomaron 3 μ L del producto de ligación (plásmido + inserto). Se tomaron tantos tubos de células electrocompetentes, según la cantidad de muestras de ADN para electroporar. Se prepararon Eppendorfs con 1 mL de LB, para colocar en la cubeta luego de electroporar. Se mezcló el producto de ligación con los 40 μ L de células

electrocompetentes en la cubeta de electroporación. Una vez que se realizó la mezcla, se encendió el equipo de electroporación (Eppendorf), y se dio un pulso de 1500 V. Una vez que se escuchó la alarma del equipo de electroporación, se le agregó rápidamente 1 mL de LB en la cubeta. El producto obtenido de la transformación se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 mL y este se dejó incubar 1 hora a 37° C. Finalmente, se sembraron 100 µL del volumen total de electroporado, con rastrillo en placa de LB/Amp/X-gal/IPTG. Las colonias recombinantes y no recombinantes fueron seleccionadas por color. En ausencia del inserto, la bacteria en un medio con el inductor IPTG y el sustrato X-gal, produce β-galactosidasa, que convierte el sustrato X-gal a una sustancia azul, apareciendo colonias de color azul. En el caso de que se encuentre un inserto interrumpiendo el gen *LacZ*, la bacteria no produce β-galactosidasa, y las colonias se observan de color blanco, las cuales corresponden a las colonias recombinantes.

4.4.4 Ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa de la colonia recombinante (PCR colony).

Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa de las colonias recombinantes con los cebadores SP6 y T7 (Tabla 4), con el fin de obtener las secuencias completas del inserto de interés, ya que estos amplifican los promotores ubicados cerca del sitio múltiple de clonación del vector pGEMT easy (Figura 35).

Tabla 4. Secuencia nucleotídica de los cebadores SP6 y T7 que amplifican el inserto de interés.

Cebadores	Secuencia
T7(Sentido)	5`-TATTTAGGTGACACTATA-3´
SP6 (antisentido)	5`- TAATACGACTCACTATAGGG -3'

Inicialmente, se seleccionó una colonia recombinante (color blanco), se tomó con la ayuda de un asa de platino y se colocó en la mezcla de reacción preparada como se indica en la tabla 5, para la PCR colony con los cebadores T7/SP6.

Tabla 5. Componentes de la mezcla de reacción para la amplificación de los genes con los cebadores SP6 y T7.

Componentes	Concentración stock	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer 5X	5 X	1 X	5
MgCl ₂	25 mM	1mM	3
dNTP´s	25 mM	0,2mM c/u	0,5
Cebador SP6	10 µM	1 µM	1,0
Cebador T7	10 µM	1 µM	1,0
Taq polimerasa	5U/1µL	0,5U	0,125
ADN	-	-	1,0
H ₂ O	-	-	13,375
Volumen total			25µL

Para la amplificación con los cebadores T7/SP6, se siguieron las condiciones establecidas por el kit de Promega (Tabla 6).

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
	94	2min	1
Desnaturalización	94	30seg	35
Hibridación	55	1min	35
	72	1 min	35
Extensión	72	10min	1
	4	α	

 Tabla 6. Condiciones del ciclado del PCR de las colonias.

Por otro lado, se llevó a cabo este mismo procedimiento pero con los cebadores específicos diseñados en este trabajo (TvPFRF/R y TvCLHF/R), siguiendo las condiciones descritas en la tabla 8 y tabla 14.

Una vez culminada la PCR de la colonia se realizó una corrida electroforética del producto obtenido en geles de agarosa al 1%, en una solución de buffer TAE 1X, el cual contenía 1 μ L de SYBR[®] Safe TM ADN stain gel (Invitrogen) por cada 10 mL de TAE. La corrida electroforética se realizó a 100 V durante 30 min. Una vez transcurrido el tiempo de corrida, se observó cada gel en un equipo de fotodocumentación (Uviti).

4.4.5 Extracción de plásmido (Miniprep).

Se realizó la extracción de plásmido o Miniprep, con el fin de purificar la secuencia específica, ya que estos pueden ser aislados fácilmente del genoma de la bacteria. La extracción de plásmidos se realizó mediante el método de cloruro de litio. Para ello, se creció un cultivo de bacterias *E. coli* TOP10 en medio LB, ON a 37° C. Al día siguiente se evaluó la D.O_{600nm}, procurando que se encontrara entre 1-

1,5. Al mismo tiempo, se precalentaron 50 μ L de H₂O (d) a 65° C por cada muestra a hidratar. Y se colocó la solución C en hielo. A continuación, se colocaron 1,5 mL de cultivo en un tubo Eppendorf y se centrifugó por 1 min a 22440 xg. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento con 200 µL de solución A (50 mM Glucosa; 10 mM EDTA; 25 mM Tris) hasta que la mezcla fue homogénea y se dejó 5 min a TA. Luego, se añadieron 400 µL de la solución B (lisis) (0,2 M NaOH; 1% SDS) al tubo con la mezcla. Se mezcló por inversión varias veces y se incubó en hielo por 5 min. Posteriormente, se añadieron 300 µL de la solución C (neutralización) (29,4 gr/100 mL Acetato de potasio; 11,5 mL/100mL ácido acético glacial; se mantiene la solución a 4º C). Se mezcló por inversión observándose un precipitado blanco. Esta mezcla, se centrifugó por 10 min a 22440 xg. Paralelamente, se preparó un tubo con 500 µL de isopropanol por cada muestra realizada. Se transfirió el sobrenadante al tubo Eppendorf que contenía los 500 µL de isopropanol y se mezcló por inversión varias veces. Esto permitió el precipitado de todos los ácidos nucleicos remanentes incluyendo ADN y ARN. Se incubó la mezcla 5 min a TA y se centrifugó por 10 min a 22440 xg, descartándose el sobrenadante. Se eliminó el sobrenadante y se resupendió el sedimento con 200 µL de TE (TrisCl a pH 8 y 1 mM EDTA). Se añadieron 200 µL de cloruro de litio a 5M. Se incubó la mezcla 5min a -20° C. Se centrifugó por 10 min a 22440 xg y se pasó el sobrenadante a un Eppendorf con 240 µL de isopropanol. La mezcla se incubó 5 min a TA y se centrifugó por 10 min a 22440 xg. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 mL de etanol al 70%. Luego, se centrifugó 5 min a 22440 xg, se descartó el sobrenadante y se dejó secar

el sedimento 5 min a 65° C en un concentrador (LABCONO). Una vez seca la muestra, se colocaron 50 μ L de agua estéril. Se resuspendió suavemente con la pipeta y se dejó a TA por 10 min. Finalmente, cada producto de la extracción de plásmido se evaluó en geles de agarosa al 1%, observándose los mismos en un equipo de fotodocumentación (Uviti).

4.4.6 Cortes con enzimas de restricción de los plásmidos recombinantes.

Paralelamente al análisis de la secuencia, se confirmó la presencia del inserto mediante el corte con enzimas de restricción, expuesto en la sección 4.3.4, pero en este caso se empleó el producto obtenido de la extracción de plásmido (Miniprep) correspondiente al gen que codifica la PFR2 y la secuencia parcial de la CLH.

4.5 Análisis de la secuencia de nucleótidos de los clones obtenidos.

Con el fin de hacer la comparación entre la secuencia putativa y la secuencia obtenida por secuenciación automática del gen que codifica la PFR2 y la secuencia parcial de la CLH, se hicieron los alineamientos múltiples que pudieran revelar características conservadas de la familia. Para identificar esa relación evolutiva se evaluó la cantidad de similitud compartida, para poder construir posteriormente un árbol filogenético.

4.5.1 Análisis de la secuencia de nucleótidos de los clones TvPFR2 y Tv_nCLH.

Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa de la colonia recombinante amplificada con los cebadores T7/SP6, con el fin de obtener la secuencia completa de la PFR2 y la secuencia parcial de la CLH. Para el análisis de la secuencia definitiva, se tomaron 20μ L (≈ 40 ng/ μ L) del producto obtenido de la PCR colony junto con los cebadores T7/SP6 sentido y antisentido con una concentración final de 5pmolar, los cuales fueron enviados a la UEGF para amplificar los fragmentos de interés.

En el caso de la TvPFR2, al ser de gran tamaño, se diseñaron cebadores internos que permitieron obtener la secuencia completa del gen. Para el diseño de estos cebadores se utilizó el protocolo descrito en la sección 4.2.2. Para la PCR se estandarizó tanto la mezcla de reacción como el gradiente de temperatura.

4.5.2 Alineamiento de las secuencias.

Una vez que se obtuvieron las secuencias definitivas de cada gen, se realizó un análisis *in sílico* para determinar homología con la secuencia putativa obtenida por bioinformática mediante el programa BLAST (www.ch.embnet.org). Para comparar las secuencias de nucleótidos obtenidos, se realizó un estudio de análisis múltiple, mediante el programa MultAlin (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/).
4.5.3 Árbol filogenético basado en el análisis de la secuencia de cada proteína de diferentes organismos.

Un árbol filogenético es un diagrama que indica las relaciones entre las diversas especies o genes presentes, así como la distancia evolutiva que existe entre ellos. Para la realización de dicho árbol se siguió el siguiente protocolo:

Inicialmente, se agruparon las secuencias aminoacídicas de cada proteína de los diferentes organismos en el programa ClustalX, este programa generó un alineamiento global de un conjunto de secuencias. La reconstrucción filogenética fue realizada en el programa MEGA 4 y las secuencias fueron analizadas por el método de Neighbor-joinig para el caso de la PFR2 y el método de Kimura en el caso de la secuencia parcial de la CLH. Los árboles fueron calculados a partir del número de diferencias entre aminoácidos con 500 replicaciones de bootstrap.

4.5.4 Análisis antigénico de la proteína PFR2 y la secuencia peptídica parcial de la CLH.

El análisis antigénico se realizó con el fin predicir los posibles péptidos antigénicos y que a futuro sirviesen como blanco terapéutico.

El análisis por bioinformática del gen que codifica la PFR2 y la secuencia parcial de la CLH se realizó con el programa ANTHEPROT (http://antheprotpbil.ibcp.fr/anthe_download.php?recipient=ANTHEPROT). Este programa es un software de análisis de secuencias de proteínas que permite el manejo de la secuencia de la proteína y los datos de una manera muy interactiva.

5.1 Proteína paraflagelar 2 de T. vivax (TvPFR2).

5.1.1 Obtención de ADN de *T. vivax* de un ovino sano.

Una vez alcanzado el pico de parasitemia, se analizó la sangre obtenida por técnica parasitológicas (Brener) y PCR, según los protocolos descritos en la sección de metodología. El pico de parasitemia se alcanzó el día 11, observando alrededor de 20try/campo, teniendo una parasitemia de 1×10^7 try/mL. Dicha sangre fue utilizada para la identificación y clonación de TvPFR2.

5.1.2 Diseño de los cebadores a partir de la secuencia putativa del gen que codifica la PFR2.

Mediante la búsqueda en las bases de datos de la secuencia del gen que codifica la PFR2, se identificó una secuencia putativa del gen de *T. vivax* Y486 asociado al movimiento del parásito. La secuencia encontrada fue de 1800 pb (Figura 10), codificante de un péptido de 600 aminoácidos y una masa molecular de 69 kDa. En la figura 10 se observa el anclaje de los cebadores en el extremo anterior y posterior de la secuencia de la PFR2. El cebador sentido, TvPFRF, se ancló en la hebra 3⁻ 5⁻ que permitió la amplificación de la hebra complementaria, mientras que el cebador antisentido, TvPFRR, se ancló por complementariedad de bases en la hebra 5′- 3′ para la amplificación de la hebra molde.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
TvY486PFR2 TvPERF	ATGAG	CGCGAAGGAA	AGTCGGAACA	GTGGACCCC	GCGGACCAGC	AGCAGCCCGCG	GTGCCCGAG	GTGACGGACA	TCACGCTGGA	GCCGCCCGC	AAGCAGAAGA	TCCACAACCT	GAAGCTGAAAA	аствест
TvPFRR Consensus	atgag	cgcgaaggaa	agtcg											
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
TvY486PFR2 TvPFRF	GCCTG	TCGAATGAG	GAGTACGTGC	AGGACCTGCI	ATGTCTCCAC	GTGGAGCGAGA	ICGCAGCGGC	AGAAGCTGCA	GACGGCGCAC	GAGAAGGCGC	ACGAGCTGCT	TGCAGCAGTG	GAGGGTGGGA(CGAAGTG
Consensus		•••••		•••••		•••••	•••••	•••••			•••••	•••••	•••••	
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
TvY486PFR2 TvPFRF TvPFRR	ĠAGCC	TGACGGAGG	CATACGACAT	CAGGAAGCTO	ATGCGCGTG	TGCGGCCTGGA	IGCTCTCCGT	GCGCGAGCTG	TACAAGCCGG	AGGATAAGCC	GCAGTTCATG	GAGATCGTGG	CGCTGAAGAAG	ACCCTG
consensus	201	400		490	420				470		400	E00	E10	E90
TvY486PFR2 TvPFRF TvPFRR	I Aacga	GCTGAAGCA	GCACCACAAC	AAGACGCGCI	CGGTGTCGT	TCACCGGCACG	ATCGACAAC	GCCATTGCGA	AGCTGGAGAA	GATCGAGGAT	GAGCTGCGCC	GTTCGCAACT	GGATGCGTCC	1 SAAATGG
Consensus	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • •	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • •	•••••	•••••	•••••	•••••
	521 I	530 +	540	550	560	570 +	580	590 +	600	610	620	630	640	650 1
TvY486PFR2 TvPFRF TvPFRR Consensus	CACAG	GTCCCCGTG	GCGATGCTGA	AGAACGTGGA	IGGACTGCAT	GAACGTGACTG	ITCGTGCAGA	CCGCGCTGCT	TGGCAATGAG	GAGCAGATCA	AGCTGCAGCT	GGAAGCAATTI	AAGAAGGCAAO	GGATAT
	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
TvY486PFR2 TvPFRF TvPFRR Consensus	CCGCA	ACGTTGCCAT	TTGCGGACGG	TGAGATGGCO	GATCGCTGAG	GAGCAGTACTA	ICATCAAGGC	GCAGCTGCTG	GAGCACCTCG	TGAGCTCGT	GCCGACAAG	TTCCGCATCA	TTGGCCAGACO	I GAGGAC
conconcuc	781	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
TvY486PFR2 TvPFRF TuPFPP	GAGAA	CAAGCAGTTO	CAGCAAGATC	CACGAGGTG	CAGAAGAAGT	CGTTCCAGGAG	GCCGCCGCC	ATCAAGGACG	CGAAGCGTCG	CCTGAAGCAG	CGCTGCGAGG	ACGACCTGAA	GAGCCTGCAC	GACACGA
Consensus	•••••	•••••		•••••		•••••	•••••	•••••			•••••	•••••	•••••	
	911 	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
TvY486PFR2 TvPFRF TvPFRR Consensus	TCCAG	AAGGCCGACI	CTGGAGGACG	CAGAGGCCAT	FGAAGCGCTT	TGCGTCACAGA	IAGGAGAAGT	CCGAGCGGTT(CATCCACGAG	AACCTGGACA	AGCAGGACGA	GGCGTGGCGG	CGCATCCAGGA	IGCTGGÁ
	1041	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
TvY486PFR2 TvPFRF TvPFRR	1 6C6C6	TGCTGCAGCO	GCCTTGGGAC	GGAGCGCTT	CGAGGAGGTC	AAGCGGCGCAT	CGAGGAGAA	TGATCGCGAG	GAGAAGCGCA	AGGTGGAATA	CCAGCAGTTC	CTCGATGTGT	GTGGGCAGCA(CAAGAAG
Consensus	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • •	•••••	• • • • • • • • • • • •	•••••	•••••	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • •	•••••	•••••	•••••	•••••
	1171 	1180 +	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300 I
TvY486PFR2 TvPFRF TvPFRR Consensus	стаст	TGAGCTGTC	CGTGTACAAC	TGTGACCTT	SCGCTGCGGT	GCATGGGCATG	ICTGGAGGAG	ATAATGGCAGI	AGGGCTGCAG	CGCTATCAAG	TCGCGCCACG	ACAAGACATG	CGAGGAGCTT	SCAAGCC
	1301	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430
Tv¥486PFR2 TvPFRF TvPFRR	I Tgagc	CTGCAGGTG	CACCAGGAGT	ACCTGGAGGG	CGTTCCGCCG	CCTGTACAAAA	ICGTTGGGCC	AGCTGGTGTA	CAAGAAGGAG	AGCGCCTCG	AGGAGATTGA	CCGCAACATC	CGCACGACGCA	1 1tattca
Consensus	•••••													
TvY486PFR2 TvPFRF TvPFRR	1431 Actgg	AGTTCGCCAT	1450 TTGAGACATT	1460 CGACCCGAA(1470 CGCGAAGCAG	1480 CACTCTGACCG	1490 GAAGAAGGA	1500 GCTGTACAAG(1510 CTGCGTGCGC	1520 AGGTGGAGGA	1530 GGAGCTGGAG	1540 Atgctgaagg	1550 ACAAGATGGCO	1560 1 GCAGGCG
Consensus	•••••	•••••	• • • • • • • • • • •	•••••		•••••	•••••	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • •	•••••	•••••	•••••	
	1561	1570	1580	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690
TvY486PFR2 TvPFRF TvPFRR Consensus	ĊTGGA	GATGTTTGGO	CCCGACGGAG	GACGCGCTG	ACCAGGCCG	GCATCGÁGTTC	GTGCACCCT	GCCGAGGAGG	TGGAGGATGG	CAATATGAAC	CGCCGCAGCA	AGATGGTGGA	GTACCGTGCGG	CACCTGĠ
	1691	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800		
TvY486PFR2 TvPFRF TvPFRR	I Ctaag	CAGGAGGAA	GTGAAGATTG	CGGCCGAGCO	SCGAGGAGCT	CAAGCGCTCCA	AGATGCTAC	AGAGCCAACA	GCACCGCGGC	CGCACGGTGC C	AGCAGATCAC Agcagatcac	GCAGTAG GCAGTAG		
LIUISENSUS										C	ascasgCgC	eudeude		

Figura 10. Secuencia nucleotídica putativa del gen que codifica la PFR2 de TvY486 de 1800 pb, obtenida según las bases de datos. Mostrando el anclaje (hibridación) de los iniciadores TvPFRF/R.

5.1.2.1 Diseño de los cebadores TvPFRF y TvPFRR.

Para la amplificación del gen que codifican la PFR2 de TvLIEM176 fue necesaria el diseño de cebadores específicos.

Con base en el marco abierto de lectura (ORF), se diseñaron los cebadores sentido y antisentido, como se observa en la tabla 7. El cebador sentido, denominado TvPFRF, de 19 pb y el cebador antisentido, denominado TvPFRR, de 18 pb, presentaron una temperatura de melting de 63,8° C y 60,8% en contenido de GC.

Tabla 7. Secuencia de los cebadores que amplifican el gen que codifica la PFR2.

Secuencia	Cebadores	Secuencia	Tm (° C)	Th(° C)
TvPFR2	TvPFRF (Sentido)	5'- ATGAGCGCGAAGGAAGTCG- 3'	60,5	63.8
	TvPFRR (Antisentido)	5'- GTCGTCTAGTGCGTCATC - 3'	60,4	,.

5.1.3 Ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación del TvPFR2.

La estandarización de la PCR permitió determinar las cantidades y concentraciones adecuadas de los componentes de la reacción para la amplificación del TvPFR2 (Tabla 8). Al mismo tiempo, se estableció el programa de ciclado y la temperatura de hibridación para el TvPFR2.

Componentes	Concentración stock	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer	5X	1 X	2,5
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	0,75
dNTP's	10 mM	0,08 mM	0,2
Cebador TvPFRF	10 µM	0,3 μM	0,75
Cebador TvPFRR	10 µM	0,3 μM	0,75
Taq polimerasa	2,5U/1µL	0,5U	0,3
ADN	-	-	2
H ₂ O	-	-	17,75
Volumen total			25µL

Tabla 8. Componentes de la mezcla de reacción para la amplificación del TvPFR2.

Se sometió la mezcla de reacción a un gradiente de temperatura para estandarizar la PCR y obtener la temperatura óptima de hibridación, evitando la inespecificidad, de acuerdo a las condiciones descritas en la tabla 9. En donde se realizaron 3 fases: Una fase de desnaturalización a 94° C, una fase de hibridación, en la cual se realizó un gradiente de temperatura y una fase de extensión a 72° C.

 Tabla 9. Condiciones de ciclado para la amplificación del gen que codifica la PFR2.

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
	94	5min	1
Desnaturalización	94	1 min	33
Hibridación	55- 64	1 min	33
	72	2 min	33
Extensión	72	10min	1
	4	α	

En la figura 11 se muestra un registro fotográfico de un gel correspondiente a los productos de PCR obtenidos por un gradiente de hibridación de la temperatura, desde 55° C a 64° C, observándose en todos los carriles una banda de 1800 pb, que pudiera corresponder al gen que codifica la PFR2. Como se puede observar, a medida que se aumentó la temperatura disminuyó el número de bandas. A partir de estos resultados se seleccionó 64º C como la temperatura de hibridación óptima para la amplificación de TvPFR2 (carril 9).



Figura 11. Registro digital de la corrida electroforética de los productos de amplificación por PCR del TvPFR2 en un gradiente de temperatura de hibridación, con los cebadores TvPFRF y TvPFRR. Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb. Carril 2: ADN_{o.i} con TvLIEM176 (55° C). Carril 3: ADN ovejo sano (control). Carril 4: H₂O (control). Carril 5: ADN_{o.i} con TvLIEM176 (57° C). Carril 6: ADN_{o.i} con TvLIEM176 (59° C). Carril 7: ADN_{o.i} con TvLIEM176 (61° C). Carril 8: ADN_{o.i} con TvLIEM176 (63° C). Carril 9: ADN_{o.i} con TvLIEM176 (64° C). Electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %.

5.1.3.1 Purificación del producto de PCR del TvPFR2.

En la figura 12 se muestra el registro digital del producto de PCR purificado por minicolumnas. Se observa una banda de 1800 pb que pudiera corresponder al TvPFR2.



Figura 12. Registro digital de la corrida electroforética del producto de PCR purificado del TvPFR2. Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb. Carril 2: TvPFR2 purificado. Electroforesis en geles de agarosa al 1%.

5.1.3.2 Corte con enzimas de restricción.

A partir de la secuencia putativa obtenida de la PFR2 se realizó un mapa de restricción, con el fin de seleccionar la enzima de restricción que cortáse la secuencia escogida en fragmentos conocidos y que únicamente cortáse el inserto de interés. (Figura 13).



Figura 13. Mapa de restricción de la secuencia putativa del gen que codifica la PFR2 utilizando el programa NEBCUTTER. Se señala con un recuadro en negro la enzima de restricción utilizada para la digestión.

Con base en la información obtenida del mapa, se sometió el producto de PCR purificado a una digestión en presencia de la enzima *Eco*RV. En la figura 14 se puede observar el producto del corte con la enzima de restricción, correspondiente a dos fragmentos, uno de 1152 pb y otro de 648 pb, cuyos tamaños están acordes a los esperados según el mapa de restricción obtenido por bioinformática.



Figura 14. Registro digital de la corrida electroforética de los productos del corte con la enzima EcoRV del TvPFR2. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb. Carril 2: Producto de PCR del TvPFR2 digerido con la enzima *Eco*RV. Carril 3: Producto de PCR de PFR2 sin digerir. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %.

5.1.3.3 Secuenciación de TvPFR2.

El producto de PCR correspondiente a la PFR2 fue enviado al centro de secuenciación automática, pero no hubo resultado en los datos enviados por el laboratorio de la UEGF. Sin embargo, como se verá más adelante, si se obtuvieron resultados de la secuencia a partir del clon del TvPFR2 (Ver figura 20).

5.1.4 Clonación del TvPFR2 en el vector de clonación pGEM-T easy.

Una vez obtenido el producto de amplificación del TvPFR2, se procedió a la construcción de la molécula recombinante, pGEMT/TvPFR2. La construcción, por un proceso de electroporación, se incorporó a la célula de *E. coli* TOP10. Posteriormente, se hizo un cultivo y se seleccionaron las colonias que hubiesen incorporado el vector con el inserto de interés.

5.1.4.1 Obtención de colonias recombinantes.

En la Figura 15 se observan tres placas. La placa de la izquierda corresponde a un control LB/Amp, en la cual no se observó crecimiento de la *E. coli* TOP10, correspondiente al control negativo. La placa del centro, corresponde a una placa control de LB en la cual se observó un césped bacteriano (control postivo), y en la placa de la derecha se observaron las colonias bacterianas obtenidas de la transformación bacteriana. En la transformación se obtuvieron catorce colonias blancas y cincuenta colonias azules. Este resultado indica una baja eficiencia en la transformación.



Figura 15. Placas LB con la transformación en *E. coli.* TOP10/PFR2/pGEMT. Se observan las colonias recombinantes (color blanco), y las colonias no recombinantes (color azul).

5.1.4.2 Determinación de la presencia del TvPFR2 por PCR de la colonia.

Las colonias crecidas provenientes del proceso de transformación bacteriana se sometieron a extracción de ADN para posterior análisis por PCR.

En la figura 16, se muestra el producto por PCR del ADN de dos colonias obtenidas de la transformación, tanto con los cebadores específicos (TvPFRF/TvPFRR) como con los cebadores T7/SP6. Al mismo tiempo, puede observarse en el carril 4 (control positivo), una banda de 1800 pb, que es del mismo tamaño que la banda obtenida con los cebadores específicos de las colonias transformadas (carril 2 y 5), corroborando de este modo los resultados que se esperaban de la transformación. Por otro lado, en el carril 3 y 6 se observa una banda aproximadamente 1983 pb correspondiente a la amplificación de la TvPFR2 con los cebadores T7/SP6.



Figura 16. Registro digital de la corrida electroforética de los productos de PCR de las colonias obtenidas de la transformación del TvPFR2. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb; carril 2: ADN de la colonia 1 amplificada con los cebadores específicos; carril 3: ADN de la colonia 1 amplificada con los cebadores T7/SP6; carril 4: Producto de PCR purificado de PFR2 con los cebadores específicos; carril 5: ADN de la colonia 2 amplificada con los cebadores específicos; carril 6: ADN de la colonia 2 amplificada con los cebadores T7/SP6; carril 7: H₂O. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %.

5.1.4.3 Extracción de plásmidos (Miniprep).

En la figura 17 se presenta la electroforesis de los plásmidos extraídos de 2 colonias obtenidas de la transformación por electroporación y su posterior selección con ampicilina. Se observa una variación en la migración del ADN, entre el carril 2 y 3, correspondientes a las colonias que poseen el inserto, en relación al carril 4 que es el plásmido control.



Figura 17. Registro digital de la corrida electroforética de los productos de ADN plasmídico purificado correspondientes al TvPFR2. Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb; carril 2: ADN plasmídico de la colonia 1; carril 3: ADN plasmídico de la colonia 2; Carril 4: ADN plasmídico de la colonia azul (Control negativo). Electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

5.1.4.4 Cortes con enzimas de restricción.

Una vez extraídos los plásmidos e identificada la presencia del inserto, se procedió al corte con enzimas de restricción del fragmento de interés, utilizándose para ello las enzimas *Eco*RI y *Eco*RV. En la figura 18 se muestra los productos de la digestión de los plásmidos, en la cual 2 de ellos tienen el fragmento de interés (carril 2 y 4), observándose una banda de 1800 pb que coincide con el tamaño esperado de la digestión con *Eco*RI. También se evidencia la presencia de una banda de 4815 pb en los carriles 3 y 5, correspondientes a la digestión con *Eco*RV, la cual lineariza el vector recombinante.



Figura 18. Registro digital de la corrida electroforética de los productos de la digestión del ADN plasmídico de la colonias 1 y 2, que poseen el TvPFR2, con las enzimas *Eco*RI y *Eco*RV. Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 Kb; carril 2: colonia 1, digestión del ADN plasmídico con *Eco*RI; carril 3: colonia 1 digestión del ADN plasmídico con *Eco*RI; carril 3: colonia 1 digestión del ADN plasmídico con *Eco*RI; carril 5: colonia 2 digestión del ADN plasmídico con *Eco*RV; carril 6: control negativo (ADN plasmídico de una colonia azul).

5.1.5 Comparación y análisis de la secuencia del TvPFR2.

Como la secuencia del gen que codifica la PFR2 es de extenso tamaño, se necesitaron distintos pares de cebadores para la obtención de la secuencia completa. Para ello, se diseñaron dos pares de cebadores internos denominados TvPFRR1/TvPFRF1 y TvPFRF2/TvPFRR2, que amplificaron en menor tamaño la secuencia del gen (Tabla 10).

Tabla 10. Secuencia de los cebadores internos que amplifican regiones del gen

 putativo de la proteína PFR2.

Cebadores	Secuencia	Nucleótidos	Temperatura de hibridación
TvPFRF1 (Sentido)	5'-TGAAGCAGCACCACAACAAG- 3'	20	52 9 C
TvPFRR1 (Antisentido)	5'- GTTCCTCGATGTGTGTGGGG - 3'	19	52°C
TvPFRF2 (Sentido)	5'-CAGACGGAGGACGAGAAC- 3'	18	
TvPFRR2 (Antisentido)	5'- GATTGACCGCAACATCCGC- 3'	19	52° C

En la figura 19, se observa la amplificación del gen que codifica la PFR2 con los cebadores T7/SP6, los cebadores específicos diseñados inicialmente en este trabajo y los dos pares de cebadores internos.



Figura 19. Registro digital de la corrida electroforética de los productos de PCR con los cebadores SP6 y T7, TvPFRF y TvPFRR; TvPFRF1 y TvPFRR1; TvPFRF2 y TvPFRF2. Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb; carril 2: colonia 1 amplificada con los cebadores T7/SP6; carril 3: colonia 2 amplificada con los cebadores T7/SP6; carril 4: colonia 1 amplificada con los cebadores PFRFF y PFRR; carril 5: colonia 2 amplificada con los cebadores PFRF1 y PFRR; carril 5: colonia 2 amplificada con los cebadores PFRF1 y PFRR; carril 7: colonia 2 amplificada con los cebadores PFRF1 y PFRR1; carril 7: colonia 2 amplificada con los cebadores PFRF1 y PFRR1; carril 8: colonia 1 amplificada con los cebadores PFRF2 y PFRR2; carril 9: colonia 1 amplificada con los cebadores PFRF2 y PFRR2; carril 9: colonia 1 amplificada con los cebadores PFRF2 y PFRR2; carril 9: colonia 1 amplificada con los cebadores PFRF2 y PFRR2; carril 9: colonia 1 amplificada con los cebadores PFRF2 y PFRR2; carril 9: colonia 1 amplificada con los cebadores PFRF2 y PFR2; carril 9: colonia 1 amplificada con los cebadores PFRF2 y PFR2; carril 9: colonia 1 amplificada con los cebadores PFRF2 y PFR2; carril 10: Producto de PCR purificado; carril 11: ADN de ovejo con los cebadores PFRF1 y PFRR1; carril 12: ADN de ovejo con los cebadores PFRF2 y PFR2.

En la Figura 20 se observa el alineamiento entre la secuencia obtenida en el GenBank (HE573024.1) y la secuencia del TvPFR2, obtenida por secuenciación automática (UEGF- IVIC), con una identidad de 95% entre ellas.



Figura 20. Alineación entre la secuencia del TvPFR2, de la colonia 1, y la secuencia del TvY486PFR2, utilizando el programa Multialin.

Al igual que el análisis de la secuencia del gen que codifica la PFR2 de TvY486, se realizó un análisis del TvPFR2, producto de un clon obtenido por secuenciación automática, mediante la comparación y el alineamiento de secuencias reportadas de genes obtenidos a partir de bases de datos. En la tabla 12, se puede observar el análisis de la secuencia correspondiente al TvPFR2, el cual presentó identidad con *T. cruzi, Leishmania* sp, entre otros.

Tabla 11. Estudio comparativo, con base en el BLAST, entre el TvPFR2 con distintos organismos a nivel de la cobertura y de la identidad máxima en nucleótidos.

COBERTURA	E VALUE	MAX IDENT
100%	0.0	96%
98%	0.0	84%
96%	0.0	85%
96%	0.0	82%
95%	0.0	81%
91%	0.0	82%
95%	0.0	82%
96%	0.0	81%
91%	0.0	82%
98%	0.0	81%
98%	0.0	81%
	COBERTURA 100% 98% 96% 96% 95% 91% 96% 91% 98% 98%	COBERTURA E VALUE 100% 0.0 98% 0.0 96% 0.0 96% 0.0 96% 0.0 96% 0.0 96% 0.0 95% 0.0 91% 0.0 95% 0.0 91% 0.0 95% 0.0 95% 0.0 95% 0.0 95% 0.0 95% 0.0 98% 0.0

A su vez, se realizó un estudio comparativo de la secuencia nucleootídica y aminoacídica del TvPFR2 con otros tripanosomatideos como se observa en la tabla 12.

Tabla 12. Estudio comparativo a nivel de la secuencia aminoacídica del TvPFR2 mediante alineamiento con otros tripanosomatideos.

PROTEÍNA PARAFLAGELAR 2 DE	COBERTURA	E VALUE	MAX IDENTIDAD
Trypanosoma vivax Y486	100%	0.0	91%
Trypanosoma brucei TREU927 (69 kDa)	100%	0.0	84%
Trypanosoma evansi (69 kDa)	100%	0.0	84%
Trypanosoma congolense IL3000 (69 kDa)	100%	0.0	84%
Trypanosoma cruzi strain CL Brener (69 kDa)	98%	0.0	82%
Crithidia fasciculata (69 kDa)	96%	0.0	78%
Leishmania braziliensis (69 kDa)	96%	0.0	78%
Leishmania major	96%	0.0	78%
Leishmania mexicana	96%	0.0	77%
MHOM/GT/2001/U1103			

5.1.5.1 Árbol filogenético de la proteína PFR2.

Con los resultados obtenidos, se realizó un árbol filogenético a través de las secuencias aminoacídicas de la PFR2.

En la figura 21 se muestra el árbol filogenético con las relaciones evolutivas de las secuencias correspondiente al TvPFR2 con distintos organismos, ubicando a *T. vivax* en la misma rama de *T. cruzi, T. brucei* y *T. evansi.*



Figura 21. Árbol filogenético de la secuencia aminoacídica de la PFR2 de distintos tripanosomatideos. Método de Neighbor-Joining. Los números en las bases de las ramas significan el porcentaje de sustitución derivado de 500 replicas.

5.1.5.2 Características Físico-Químicas de la proteína PFR2.

Las características físico-químicas de las proteínas muestran la antigenicidad, hidrofobicidad, hidrofibicidad y accesibilidad al solvente. En la figura 22, la gráfica amarilla representa los segmentos antigénicos. La gráfica roja, indica el carácter hibrofóbico de la proteína, es decir que ésta es menos soluble en agua que en un solvente apolar. La gráfica azul, indica el carácter hidrófilo que es la propiedad que poseen las proteínas a ser más solubles en agua que en un disolvente apolar. Por su parte, la gráfica verde indica la accesibilidad al solvente, es decir, es la propiedad de una cadena lateral de estar expuesta al solvente. En la figura 22 se encuentra el análisis de las características físico-químicas de la PFR2 de *T. vivax* de acuerdo a lo expresado en la introducción de esta sección.



Figura 22. Predicción de antigenicidad, hibrofobicidad, hidrofibicidad y accesibilidad al solvente de la proteína PFR2 de TvLIEM176, utilizando el programa Antheprot.

5.2 Secuencia parcial de la clatrina de *T. vivax* (Tv_nCLH)

5.2.1 Obtención de ADN de T. vivax de un ovino sano.

Una vez alcanzado el pico de parasitemia, se analizó la sangre obtenida por técnica parasitológicas (Brener) y PCR, según los protocolos descritos en la sección de metodología. El pico de parasitemia se alcanzó el día 9, observando alrededor de 20try/campo, teniendo una parasitemia de 1×10^7 try/mL. Dicha sangre fue purificada por el método descrito por González y colaboradores (2006), quedando libre de glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas. Posteriormente, se realizó la extracción de ADN a los parásitos. El ADN de parásitos purificados fue utilizado para la identificación y clonación de Tv_nCLH.

5.2.2 Diseño de los cebadores a partir de la secuencia putativa de la secuencia parcial de la clatrina.

Se realizó la búsqueda en las bases de datos como Tritryp, GeneDB y GenBank de la secuencia putativa de la CLH de *T. vivax*, encontrándose que está asociada a un sistema de transporte de sustancias, partículas y/o moléculas. Se seleccionó una secuencia parcial putativa de la región N-terminal de la CLH, de 535 pb y codificante de un péptido de 178 aminoácidos. En la figura 23 se observa el anclaje de los cebadores en el extremo anterior y posterior de la secuencia parcial de la CLH. El cebador sentido TvCLHF se ancla en la hebra 3⁻ 5⁻ que permitió la amplificación de la hebra complementaria, mientras que el cebador antisentido

TvCLHR se ancla por complementariedad de bases en la hebra 5´- 3´ para la amplificación de la hebra molde.



Figura 23. Secuencia nucleotídica putativa de la secuencia parcial de la CLH de TvY487 de 535 pb, obtenida según las bases de datos. Mostrando el anclaje de los cebadores TvCLHF/R.

5.2.2.1 Diseño de los cebadores TvCLHF y TvCLHR.

Para la amplificación de la secuencia parcial de la CLH de TvLIEM176 fue necesario el diseño de cebadores específicos.

Con base en el ORF, se diseñaron los cebadores sentido y antisentido, como se observa en la tabla 13. Los cebadores para amplificar la Tv_nCLH se denominaron TvCLHF (sentido), de 24 pb, y TvCLHR (antisentido), de 23 pb, presentando una temperatura de hibridación de 59° C y 52,1% en contenido de GC.

 Tabla 13. Secuencia de los cebadores que amplifican la secuencia parcial de la CLH.

Secuencia	Cebadores	Secuencia	Tm (° C)	Th (°C)
TvnCLH	Tv _n CLHF (Sentido)	5`-CATGGATTCGGTTCTATAGCTGAT-3`	59,6	50 % C
	Tv _n CLHR (Antisentido)	3`- GGTGTATTGTAGTTGAGCTCGGC-5´	59,4	59°C

5.2.3 Ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la Tv_nCLH .

La estandarización de la PCR permitió determinar las cantidades y concentraciones adecuadas de los componentes de la reacción para la amplificación de la Tv_nCLH (Tabla 14). Al mismo tiempo, se estableció el programa de ciclado y la temperatura de hibridación para la TvnCLH.

Tabla 14. Componentes de la mezcla de reacción para la amplificación de la Tv_nCLH .

Componentes	Concentración stock	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer 5X	10 X	1 X	2,5
MgCl ₂	50 mM	3 mM	1,5
dNTP's	10 mM	0,3 mM	0,75
Cebador TvCLHF	10 µM	0,3 μM	0,75
Cebador TvCLHR	10 µM	0,3 μM	0,75
Taq polimerasa	2,5U/1µL	0,5U	0,2
ADN	-	-	1,5
H ₂ O	-	-	17,05
Volumen total			25µL

En la figura 24 se muestra un gel de electroforesis de la reacción de PCR sometida a un gradiente de temperatura de 53° C a 59° C, en donde se observa una banda de 535 pb correspondiente a la Tv_nCLH , proveniente de ADN de parásitos

purificados (ADNpp). Se tomó 59° C (carril 5) como la temperatura de hibridación óptima para la amplificación de la Tv_nCLH . En el carril 3 se observa un gran número de bandas correspondiente a una contaminación probablemente de algún componente de la mezcla de reacción.



Figura 24. Registro digital de la corrida electroforética de los productos de amplificación por PCR de la TvnCLH en un gradiente de temperatura de hibridación, con los cebadores TvCLHF y TvCLHR. Carril 1: Marcador de peso molecular 100pb. Carril 2: ADNppTvLIEM176 (53° C). Carril 3: ADNpp TvLIEM176 (55° C). Carril 4: ADNpp TvLIEM176 (57° C). Carril 5: ADNpp TvLIEM176 (59° C).Carril 6: ADN con ovino sano. Carril 7: H₂O. Electroforesis en gel de agarosa al 2%.

En la tabla 15 se observan las condiciones utilizadas para la amplificación

de la Tv_nCLH.

Fase	Temperatura (° C)	Tiempo	Ciclos
	94	5min	1
Desnaturalización	94	1 min	33
Hibridación	59	1 min	33
	72	1 min	33
Extensión	72	10min	1
	4	α	

Tabla 15. Condiciones de incubación para la amplificación de la Tv_nCLH.

5.2.3.1 Purificación del producto de la TvnCLH.

En la figura 25 se observa el registro digital del producto de PCR purificado por minicolumnas. Se observa la banda de 535 pb que pudiera corresponder a la Tv_nCLH .



Figura 25. Registro digital de la corrida electroforética de los productos de PCR purificado de la Tv_nCLH . Carril 1: Marcador de peso molecular 100 pb. Carril 2: Tv_nCLH purificado. Electroforesis en geles de agarosa al 1%.

5.2.3.2 Corte con enzimas de restricción.

Mediante el análisis *in sílico* con el programa NebCutter, se obtuvo el mapa de restricción de la secuencia parcial putativa de la CLH (Figura 26). De dicho mapa se escogió una enzima de restricción que cortase la secuencia parcial escogida.



Figura 26. Mapa de restricción de la Tv_nCLH utilizando el programa NEBCUTTER. Se señala con un recuadro en negro la enzima de restricción seleccionada para la digestión.

Una vez seleccionada la enzima de restricción *Kpn*I se sometió el producto purificado de PCR de la Tv_n CLH a la digestión. En la figura 27 se pueden observar dos fragmentos producidos por el corte con la enzima de restricción, uno de 432 pb y otro de 103 pb, cuyos tamaños eran esperados según el mapa de restricción obtenido por bioinformática.



Figura 27. Registro digital de la corrida electroforética de los productos del corte con la enzima de restricción *Kpn*I de la Tv_nCLH . Carril 1: Marcador de peso molecular 100 pb. Carril 2: Producto de PCR de la Tv_nCLH sin digerir. Carril 3: Producto de PCR de la Tv_nCLH con la enzima *Kpn*I. Electroforesis en gel de agarosa al 2 %.

5.2.3.3 Secuenciación de la Tv_nCLH.

Con el uso de la secuencia obtenida por bioinfomática (Figura 23), se realizó el alineamiento de la secuencia obtenida por secuenciación automática Tv_nCLH con la secuencia parcial putativa de la región N-terminal, obtenida por GenBank, en donde se muestra una identidad del 88% entre ambas.



Figura 28. Alineamiento de la secuencia de la Tv_nCLH , obtenida por secuenciación automática, con la secuencia parcial putativa de la CLH de TvY486, utilizando el programa Multialin

5.2.4 Clonación de la Tv_nCLH en el vector de clonación pGEM-T easy.

Una vez obtenido el producto de amplificación de la Tv_nCLH y analizada cada secuencia, se procedió a la construcción de la molécula recombinante, pGEMT/TvCLH. El vector recombinante, por un proceso de electroporación, se

incorporó a la célula de *E. coli* TOP10. Posteriormente, se hizo un cultivo y se seleccionaron las colonias recombinantes.

5.2.4.1 Obtención de colonias recombinantes.

En la Figura 29 se observan tres placas. En la placa de la izquierda se observa una placa control de LB donde se observa un césped bacteriano, correspondiente al control positivo. La placa del centro corresponde a un control LB+ Amp, en donde no se observó crecimiento de la *E. coli* TOP10 (control negativo), y en la placa de la derecha se observaron las colonias bacterianas obtenidas de la transformación bacteriana. En esta última placa se obtuvo como producto de la transformación nueve colonias blancas y seseta y tres colonias azules. Este resultado indica una baja eficiencia en la transformación.



Figura 29. Transformación en *E.coli* TOP10/Tv_nCLH/pGEMT Se observan las colonias recombinantes (color blanco), y las colonias no recombinantes (color azul).

5.2.4.2 Determinación de la presencia de la Tv_nCLH por PCR colony.

Para determinar la presencia de la Tv_nCLH en las colonias recombinantes se hizo una PCR, observándose la presencia del inserto en 4 de las 9 colonias blancas. Se amplificó el ADN a partir de las cuatro colonias positivas con los cebadores específicos diseñados TvCLHF/TvCLHR y con los cebadores SP6 y T7 (Figura 30). Se observó una banda de 535 pb, correspondiente a la Tv_nCLH con los cebadores TvCLHF/TvCLHR en el carril 2, 4 y 6. Así mismo, se observó una banda de aproximadamente 718 pb, obtenida a partir del producto de PCR de las colonias blancas amplificadas con los cebadores SP6 y T7 (carril 3, 5 y 7).



Figura 30. Registro digital de la corrida electroforética de los productos PCR de las colonias obtenidas de la transformación de la Tv_nCLH . Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb; carril 2: ADN de la colonia 4 amplificada con los cebadores TvCLHF/TvCLHR; carril 3: ADN de la colonia 4 amplificada con los cebadores T7/SP6; carril 4: ADN de la colonia 6 amplificada con los cebadores TvCLHF/TvCLHR; carril 5: ADN de la colonia 6 amplificada con los cebadores T7/SP6; carril 6: ADN de la colonia 8 amplificada con los cebadores TvCLHF/TvCLHR; carril 7: ADN de la colonia 8 amplificada con los cebadores T7/SP6; carril 8: H₂0. Electroforesis en gel de agarosa al 2 %.

5.2.4.3 Extracción de plásmidos (Miniprep).

En la figura 31 se evidencia la integridad de 4 plásmidos resultantes de la transformación de las bacterias que integraron el Tv_nCLH. Se observa variación en el patrón de bandas, que pueden corresponder a distintos plásmidos. El carril 2 corresponde al control de ADN plasmídico de un colonia sin inserto. Los carriles 3, 4 y 5 corresponden a colonias con el inserto del Tv_nCLH.



Figura 31. Registro digital de la corrida electroforética de los productos de ADN plasmídico purificado correspondientes a la Tv_nCLH . Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb; carril 2: ADN plasmídico de la colonia azul (control negativo); carril 3: ADN plasmídico de la colonia 6; carril 4: ADN plasmídico de la colonia 8; carril 5: ADN plasmídico de la colonia 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.

5.2.4.4 Cortes con enzimas de restricción

Se seleccionaron 3 colonias blancas que dieron positivo mediante PCR de las colonias. En la Figura 32 se observa la digestión de los distintos plásmidos con dos

enzimas diferentes, *Eco*RI y *Kpn*I. En los carriles 2, 4 y 6 se muestra la digestión con la enzima *Eco*RI que liberó un fragmento con un tamaño aproximado de 548 pb correspondiente al inserto de Tv_nCLH y otro fragmento de 3015 pb correspondiente al vector pGEM-T Easy. De la digestión con *Kpn*I, en el carril 3, 5 y 7, se obtuvo que la molécula recombinante se linearizó, dando como resultado una banda de 3550 pb, correspondiente a la suma del vector y el inserto, siendo este resultado positivo para los 3 clones analizados.



Figura 32. Registro digital de la corrida electroforética de los productos de la digestión del ADN plasmídico de las colonias que poseen la TvCLH, con las enzimas EcoRI y KpnI. Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb.; carril 2: Digestión del ADN de la colonia 4 con la enzima EcoRI; carril 3: Digestión del ADN de la colonia 4 con la enzima EcoRI; carril 3: Digestión del ADN de la colonia 6 con la enzima EcoRI; carril 5: Digestión del ADN de la colonia 6 con la enzima EcoRI; carril 5: Digestión del ADN de la colonia 6 con la enzima EcoRI; carril 7: Digestión del ADN de la colonia 12 con la enzima EcoRI; carril 8: control negativo (ADN de una colonia azul digerido con EcoRI). Electroforesis en gel de agarosa al 2 %.

5.2.5 Comparación y análisis de la secuencia de la Tv_nCLH.

Una vez realizado el alineamiento de la secuencia parcial de la CLH de TvY486, obtenida por bioinformática, y la TV_nCLH obtenida por PCR (Figura 28), se realizó el alineamiento a nivel de nucleótidos de la secuencia parcial de la CLH de TvY486 con la Tv_nCLH (clon) de 535 pb (Figura 33), en donde a diferencia del alineamiento entre la secuencia obtenida por bioinformática y PCR, se obtuvo una identidad del 99% entre estas secuencias.



Figura 33. Alineación a nivel de nucleótidos de la Tv_nCLH , de la colonia 4, con la secuencia parcial de la CLH de TvY486, utilizando el programa Multialin.

La secuencia obtenida de la colonia clonada reveló una identidad con las diferentes especies de *Trypanosoma* y *Leishmania*. En la tabla 17 se observa la comparación, a nivel de nucleótidos realizada con BLAST, de la secuencia parcial de la CLH con diferentes tripanosomatideos.

Tabla 16. Estudio comparativo de los nucleótidos de la Tv_nCLH , de la colonia 4, con distintos tripanosomatideos a nivel de cobertura e identidad máxima.

CADENA PESADA DE LA CLATRINA DE	COBERTURA	E VALUE	MAX IDENT
Trypanosoma vivax	96%	0.0	99%
Trypanosoma brucei gambiense	89%	2,00E ⁻⁷⁷	73%
Trypanosoma brucei	89%	2,00E ⁻⁷⁷	73%
Trypanosoma congolense	53%	3,00E ⁻⁴⁴	74%
Trypanosoma cruzi	89%	6,00E ⁻⁴⁰	68%
Paracoccidioides brasiliensis	79%	1,00E ⁻³⁵	69%
Leishmania major	56%	$1,00E^{-23}$	68%
Leishmania mexicana	79%	2,00E ⁻²¹	66%
Leishmania donovani	56%	6,00E ⁻²¹	68%
Leishmania infantum JPCM5	56%	6,00E ⁻²¹	68%
Humano	5%	0,79	93%

5.2.5.1 Árbol filogenético de la secuencia parcial peptídica de la CLH.

Con los resultados obtenidos, se realizó un árbol filogenético a través de las secuencias peptídicas de la CLH.

En la figura 34 se muestra el árbol filogenético con las relaciones evolutivas de las secuencias peptídicas parciales de la CLH de distintos organismos, ubicando a *T. vivax* en la misma rama de los tripanosomatideos y separándolas de la secuencia del ovino y del humano. La secuencia de *T. vivax* no reveló diferencias con *T. cruzi*, reflejando un 100% de homología entre estas dos especies.



Figura 34. Árbol filogenético de la secuencia peptídica de la CLH de TvLIEM176. Modelo de distancia de Kimura de dos parámetros. Los números en las bases de las ramas significan el porcentaje de sustitución derivado de 500 replicas.

5.2.5.2 Características Físico-Químicas de la proteína PFR2 y la secuencia peptídica parcial de la CLH.

En la figura 35 se encuentra el análisis de las características físico-químicas de la secuencia peptídica parcial de la CLH de *T. vivax*, la cual está acotada por barras. Esta secuencia presenta dos grandes picos antigénicos de interés relacionado con un gran pico de hidrofibicidad.



Figura 35. Predicción de antigenicidad, hibrofobicidad, hidrofibicidad y accesibilidad al solvente del gen que codifica la CLH de TvY486 utilizando el programa Antheprot.

6. DISCUSIÓN

Los estudios que se realizaron en este trabajo consistieron en la amplificación del gen que codifica la proteína paraflagelar 2, presente en el flagelo y una secuencia parcial de la región N-terminal de la clatrina, localizada en el bolsillo flagelar de los triapanomatideos, que hasta la fecha no han sido reportados para *T. vivax*. Por lo que, el objetivo de este trabajo fue la identificación y clonación del gen que codifica la PFR2 y una secuencia parcial de la CLH de un aislado venezolano de *T. vivax* (TvLIEM176). Al ser ambas proteínas estructurales, las investigaciones sobre ellas derivan la posibilidad de convertirlas en blancos terapéuticos para el control de la enfermedad causada por este parásito (Adbille y col., 2008b; Stijlemans y col., 2011).

El curso de la infección experimental con el aislado en Venezuela de *T. vivax* LIEM176 permitió realizar el seguimiento de la infección. La fase de incubación de parásito en el hospedador fue de 4 días, coincidiendo con lo señalado con Sandoval y colaboradores (1995) y Gómez (2011). El pico de parasitemia, correspondiente a la fase aguda, se alcanzó al onceavo día de infección, en donde se obtuvieron 20 try/campo, con un valor de parasitemia de 1×10^7 try/mL. Además hubo una disminución del hematocrito y un aumento de la temperatura. Estos resultados coincidieron con la curva de parasitemia y los valores de hematocrito y temperatura reportados por Gómez (2011) para esta misma cepa.

El análisis y estudio del gen que codifica la PFR2 es muy importante, debido a que se encuentra en el filamento paraflagelar que forma parte del órgano locomotor del parásito. Si ocurriese una mutación en este gen, que impidiese la formación del filamento paraflagelar, el parásito perdería la motilidad. Por lo tanto, disminuiría la población de parásitos en sangre del hospedador (Maga y col., 1999). Santrinch y colaboradores (1997), Maga y colaboradores (1999) y Saravia y colaboradores (2005) han encontrado que la PFR2 es esencial en la formación del filamento paraflagelar y por ende en la supervivencia del parásito.

Para la amplificación del TvPFR2 fue necesario del diseño de cebadores TvPFRF/TvPFRR, con base en la secuencia putativa de la PFR2 de TvY486, ya que no hay reportes de estos iniciadores para *T. vivax* (Tabla 7). Al mismo tiempo, se diseñaron cebadores internos que permitieron obtener la secuencia completa del gen por secuenciación automática a través de un barrido de la secuencia y la construcción de una secuencia consenso (Tabla 10).

Los resultados obtenidos de la amplificación del TvPFR2 demostraron que los cebadores utilizados fueron capaces de mostrar la banda esperada de 1800 pb. El gradiente de temperatura realizado para la mezcla de reacción permitió identificar que la temperatura de hibridación fue de 64° C. Dicha temperatura fue la óptima para la amplificación de una única banda de 1800 pb (Figura 11). A menor temperatura se observó que hay mayor número de bandas, lo cual indica que hay una mayor inespecificidad. Por lo que, a temperaturas mayores se favorece la
amplificación de la secuencia de interés, ya que existe una relación de máxima afinidad entre los nucleótidos y su ADN templado (McPherson y Molle., 2006; Luque y Herráez, 2008).

Así mismo, el tamaño del gen que codifica la PFR2 de la secuencia putativa de *T. vivax* es consistente con el tamaño obtenido en otras especies de tripanosomas, sugiriendo que el tamaño de esta secuencia es conservada en la mayoría de los kinetoplastideos (Saravia y col., 2005; Abdille y col., 2008b).

El ADN utilizado para la amplificación del TvPFR2 no fue proveniente de parásitos purificados, sino de sangre de ovino infectado con *T. vivax,* debido a que la secuencia de la PFR2 no se encuentra en mamíferos, estando esta secuencia únicamente en los tripanosomatideos (Clark y col., 2005; Abdille y col., 2008a). Por otro lado, ensayos iniciales realizados con la sangre infectada dieron lugar a la amplificación del gen que putativamente codifica la PFR2, lo que deriva en un ahorro de materiales.

Como se mencionó anteriormente, la secuencia del gen que codifica la PFR2 de los tripanosomatídeos, no está presente en mamíferos, por lo que ésta podría servir como diagnóstico para determinar la presencia de *T. vivax* en el hospedador. Se conoce que *T. vivax* presenta una mecanismo de variación antigénica, en la cual tienen la capacidad de expresar el repertorio de VSG durante la infección, evadiendo así la respuesta inmune de los hospedadores y permitiendo la transmisión de los mismos a nuevos hospedadores (Gardiner y col., 1996). En este sentido, la proteína PFR2 es una proteína estructural única en los tripanosomatídeos que pudiera servir como diagnóstico, y al ser una proteína estructural podría servir como inmunógeno para el control de la tripanosomosis, ya que no evade la respuesta inmune del hospedador.

A partir de la estandarización de la PCR, se purificó el producto obtenido por centrifugación en minicolumnas, teniendo como resultado una única banda de 1800 pb. Esta purificación fue necesaria para eliminar cualquier reactivo que pueda inhibir la digestión con enzimas de restricción y la secuenciación automatizada (Figura 12). Para poder hacer la selección de la enzima se realizó el mapa de restricción *in sílico* mostrado en la figura 13. Como la enzima *Eco*RV no corta el vector de clonación a utilizar en la transformación y está disponible en el laboratorio, ésta fue la enzima seleccionada para hacer las digestiones en la práctica. Los resultados obtenidos de la digestión con *Eco*RV del producto purificado fueron los fragmentos de 1152 pb y 648 pb (Figura 14), cuyos tamaños son acordes a los esperados según el mapa de restricción, sugiriendo así la presencia del inserto adecuado.

La molécula recombinante pGEMT/TvPFR2 fue incorporada en la célula *E. coli* TOP10 por electroporación. Las colonias transformadas resultaron ser resistentes a la ampicilina, ya que el vector pGEMT easy le confiere esta resistencia (Figura 15). De las catorce colonias blancas obtenidas, todas fueron sometidas a la

mezcla de reacción con los cebadores TvPFRF/TvPFRR, teniendo como resultado que sólo dos de ellas tenían el inserto de interés. Las doce colonias blancas restantes que no poseían el inserto, pudieron ser positivas, probablemente debido a la presencia de dímeros de cebadores presentes en el producto purificado que lograron ser transformadas o debido a la presencia de un agente contaminante, tal como lo expresan McPherson y Mǿlle (2006), en el planteamiento de los posibles problemas en las transformaciones bacterianas. La baja eficiencia en la transformación también pudo deberse a problemas con el vector de clonación, que impidieron la ligación del inserto al mismo.

Las amplificaciones del ADN plasmídico con los cebadores TvPFRRF/TvPFRR permitieron realizar la amplificación del gen que codifica la PFR2 dentro del vector recombinante, mientras que los cebadores T7/SP6 permitieron amplificar el inserto en su totalidad (Figura 16). Esto se debe a que los cebadores T7/SP6 flanquean al inserto clonado de interés, sumando 183 pb desde los cebadores T7/SP6 hasta el inserto clonado (Figura 36), obteniéndose una banda acorde con el tamaño esperado como se muestra en la figura 16.



Figura 36. Secuencia nucleotídica del sitio de inserción del los cebadores T7/SP6, correspondiente al vector pGEMT.

Los resultados obtenidos del producto de purificación del plásmido (Figura 17) permitieron realizar la digestión del ADN plasmídico purificado con las enzimas de restricción, *Eco*RI y *Eco*RV, obteniendo los fragmentos esperados según el mapa de restricción (Figura 18). La enzima de restricción *Eco*RI, es una enzima que flanquea el sitio donde se inserta el gen de interés (Figura 37). Al realizar el corte con esta enzima se libera el inserto, en este caso el inserto de 1800 pb, del vector pGEMT easy que genera una banda de 3015 pb (Figura 18).



Figura 37. Mapa del vector pGEMT easy. En el lateral se observan las enzimas de restricción que cortan el vector.

Los resultados mostrados en la figura 18 de la colonia 1 (carril 3) indican que la digestión fue parcial, es decir, no actuó completamente la enzima *Eco*RV sobre todos los sitios de restricción presentes en el ADN. Esto puede deberse a la alta concentración del producto de Miniprep. Al considerar que la colonia 2 tuvo una menor cantidad de plásmido, el resultado parece indicar que el exceso de plásmido en la colonia 1, pudo inhibir la enzima, dando como resultado la digestión parcial de la colonia 1 (Luque y Herráez, 2008). En caso contrario, en el carril 5, ocurrió una digestión completa, observándose una sola banda correspondiente al vector recombinante de la colonia 2.

Cuando se compararon las secuencias del TvPFR2 amplificada por la PCR con los cebadores T7/SP6 y con los cebadores internos (Tabla 11), los cuales permitieron obtener la secuencia completa del TvPFR2, con la secuencia del gen que codifica la PFR2 de TvY486 (Figura 20), se obtuvo una identidad de 95%. Esta variabilidad entre ellas, pudiera deberse a que en este gen ocurrieron mutaciones transicionales y transversales, sustituyendo un par de bases por su alternativa o por otra de otro tipo. Por ejemplo, la sustitución del par AT por GC, en donde esta mutación podría ocasionar cambios en la sustitución de aminoácidos y por ende en la proteína resultante. Sin embargo, las mutaciones presentes en la secuencia pudieran deberse a problemas en la secuenciación de la misma, ya que solo se secuenció una vez y una única colonia. Cabe del tamaño del gen que codifica la PFR2 se encontró en los intervalos señalados en otros estudios reportados por Abdille y colaboradores (2008) y Portman y Gull (2010).

Los resultados obtenidos de la comparación aminoacídica de la proteína PFR2 con otros tripanosmatideos (Tabla 12) indicaron que la secuencia de la PFR2 es conservada en las diferentes especies de *Trypanosoma*, como lo expuso Abdille y colaboradores (2008b).

El árbol filogenético de la proteína PFR2 construido mediante el empleo de las secuencias aminoacídicas completas de la PFR2 de distintos organismos (Figura 21), reveló variabilidad entre grupos, agrupándose *T. brucei* y *T. evansi*, sin diferencias entre ellos. Al mismo tiempo, separó a los tripanosomas de las leishmanias en ramas diferentes. *L. infantum, L. major, L. mexicana* y *L. braziliensis* formaron un grupo distinto a partir de un ancestro en común. El árbol filogenético realizado por Abdille y colaboradores (2008b) mostró el mismo patrón de dos ramas que separa a las diferentes especies de *Leishmania* de las especies de los *Trypanosoma* (Anexo 1), con ausencia de *T. vivax*. Con los estudios realizados en este trabajo, se incorporó la secuencia de la proteína PFR2 en un nuevo árbol filogenético (Figura 21).

Los resultados obtenidos en este trabajo, en relación a las características Físico-Químicas, demuestran que la proteína PFR2 presenta una región antigénica, ideal para la obtención de anticuerpos. En relación a la hidropatía, los resultados señalaron que la PFR2 presenta tres regiones hidrofóbicas y 3 regiones hidrofílicas y la región de accesibilidad al solvente está estrechamente relacionada con el carácter hidrofílico de la proteína. Mientras más hidrofílica es la proteína, es más accesible al solvente, más cargas exponen y por ende es más antigénica (Figura 22) (Hofmann y Hadge, 1987). Por lo que podría usarse como inmunógeno para la creación de anticuerpos, y así poder controlar la tripanosomosis bovina.

Como se ha mencionado anteriormente, la CLH es una proteína vital en la formación de la vesícula que cubre los nutrientes que se introducen en el parásito (Landfear e Ignatushchenko, 2001). Una mutación en el gen, impide la formación de la vesícula y por ende la incorporación de nutrientes.

Al no haber reportes de oligos que amplifiquen la TvnCLH, el diseño de los cebadores se realizó con base en la secuencia parcial de la CLH de TvY486 (Figura

23). Los cebadores fueron denominados TvCLHF y TvCLHR (Tabla 13) y fueron diseñados en función de la región N-terminal, porque corresponde a una región antigénica de la proteína. Se seleccionó la secuencia parcial de 535 pb, de las 5100 pb (Anexo 2), ya que la CLH es una proteína de gran tamaño y alta masa molecular (Wakeham y col., 2003). De hecho, los resultados mostrados en la figura 34 indicaron que la clatrina es antigénica en toda su extensión, sin embargo la Tv_nCLH, acotada por las barras, demuestra que en la secuencia seleccionada se encuentran dos de los picos más antigénicos de toda la proteína. Esta secuencia de la región N-terminal fue escogida debido a que es esencial en la unión de los trisqueliones y para la completa formación de la vesícula que ayuda en la incorporación de nutrientes al interior del parásito (Landfear e Ignatushchenko, 2001; Willox y Royle, 2011).

Los resultados obtenidos de la amplificación de la Tv_nCLH demostraron que los cebadores utilizados fueron capaces de mostrar la banda esperada de 535 pb. El gradiente de temperatura realizado para la mezcla de reacción permitió identificar que la temperatura de hibridación fue de 59° C (Tabla 14). Dicha temperatura fue la óptima para la amplificación de una única banda de 535 pb (Figura 24). A menores temperaturas se observó que hay mayor número de bandas, lo cual indica que hay una mayor inespecificidad. La banda obtenida de la amplificación del ADN de parásitos purificados con los cebadores TvCLHF/R fue tenue probablemente debido a que la concentración del ADNpp fue baja, pero a pesar de esto se obtuvo una única banda sin inespecificidad. Por lo que, a temperaturas mayores se favorece la amplificación de esta secuencia (McPherson y Moller, 2006).

Para la selección de la enzima, se realizó el mapa de restricción *in sílico* mostrado en la figura 26. La enzima *Kpn*I corta el amplicón en dos fragmentos de tamaños conocidos y no corta en ningún sitio el vector de clonación. Por lo que, ésta fue la enzima seleccionada para hacer las digestiones en la práctica. El corte generó la hidrólisis del enlace fosfodiéster de cada hebra ocasionando la ruptura de la secuencia parcial de la CLH en dos bandas y/o fragmentos, uno de 432 pb y otro de 103 pb (Figura 27), estos tamaños obtenidos concuerdan con el tamaño esperado según el mapa de restricción.

Los resultados obtenidos por secuenciación automática de la secuencia parcial de la CLH amplificada por PCR presentaron un 88% de identidad con la secuencia parcial de la CLH de TvY486 (Figura 28). Como se mencionó anteriormente, la diferencia entre estas secuencias pudiera deberse a problemas en la secuenciación automática, ya que al momento de secuenciar con los cebadores TvPFRF/TvPFRR no se obtuvieron las primeras pares de bases en ambos sentidos, dando así un bajo porcentaje de identidad entre ambas secuencias.

Los resultados obtenidos de la transformación demostraron que de las nueve colonias blancas amplificadas por PCR, con los cebadores TvCLHF/TvCLHR, cuatro tenían el inserto de interés (Figura 30). El resto de las colonias, según el planteamiento de McPherson y Mǿlle (2006) pudieron ser positivas, por la presencia de dímeros de cebadores presentes en el producto purificado que lograron ser transformadas o por a la presencia de un agente contaminante.

A su vez, los cebadores TvCLHF/TvCLHR permitieron hacer la amplificación del ADN plasmídico de la Tv_nCLH dentro del vector recombinante, mientras que los cebadores T7/SP6 permitieron amplificar el inserto en su totalidad (Figura 30), ya que estos flanquean la secuencia clonada de interés.

Los resultados obtenidos con la purificación del plásmido (Figura 31) permitieron realizar la digestión del ADN plasmídico purificado con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Kpn*I dieron los fragmentos esperados según el mapa de restricción (Figura 32). Como se mencionó anteriormente, la *Eco*RI flanquea el inserto de interés (Figura 37), por lo tanto el corte del ADN plasmídico con esta enzima de restricción permitió liberar el fragmento de 535 pb del vector de clonación. Por otro lado, el corte con la *Kpn*I linearizó el fragmento, ya que esta enzima corta únicamente al vector de clonación, sugieriendo así que el amplicón corresponde a la Tv_nCLH.

Los resultados obtenidos de la comparación de la Tv_nCLH , de la colonia 6, con la secuencia parcial de la CLH de TvY486 indicaron una identidad de 99% entre ellas (Figura 33), pudiendo atribuir esta diferencia en identidad a errores en la secuenciación automática, ya que la secuencia parcial de la CLH del aislado en África mostró una homología casi perfecta con respecto a la data disponible en GenBank.

Por otra parte, la alineación de la Tv_nCLH con las secuencias de la CLH con otros organismos permitió confirmar la relación evolutiva que existe entre *T. cruzi*, y *T. vivax* descrita por Desquesnes (2004). Además, el alineamiento permitió conocer que la CLH de *T. vivax* presenta una baja identidad con la CLH del *Bos taurus*, pero con la Tv_nCLH no presentó ninguna identidad (Tabla 16). En este sentido, el árbol filogenético (Figura 34), confirmó el planteamiento expuesto ya que, la Tv_nCLH se encuentra en una rama distinta de la CLH de *Bos taurus*, por lo que ésta no interfiere en el proceso de identificación de la Tv_nCLH . Además, el árbol filogenético ubica la Tv_nCLH dentro del género de los *Trypanosoma*, evidenciando una mayor proximidad filogenética entre *T. vivax* y *T. cruzi*, que entre *T. vivax* y *Leishmania* sp, a pesar de que estos dos últimos parásitos son trasmitidos por la saliva del vector (sección salivaria), mientras que *T. cruzi* se transmite por las heces (sección stercoraria).

Por su parte, la CLH presentan una región altamente antigénica, ideal para la obtención de anticuerpos. Presenta 2 regiones hidrofílicas y dos regiones hibrofóbicas localizadas en el extremo amino terminal y otra en el extremo carboxi terminal (Figura 35). En relación a la región correspondiente a la Tv_nCLH , se observa que hay un gran pico hidrofílico que está relacionado con el pico correspondiente a la accesibilidad al solvente, por lo que se podría decir que esta

secuencia es antigénica y como se mencionó anteriormente, es ideal para la obtención de anticuerpos (Hofmann y Hadge, 1987).

Finalmente, las proteínas identificadas en este trabajo pudieran servir como posible inmunógeno para el control de la tripanosomosis en Venezuela. Para ello, se necesitan más investigaciones que finalmente puedan derivar en la creación de vacunas, como por ejemplo, aquellas que impliquen el diseño de nanoanticuerpos, en donde los antígenos serían las proteínas PFR2 y la secuencia peptídica parcial de la CLH. Dado que el bolsillo flagelar representa el 0,43% de la membrana plasmática del parásito (Hung y col., 2004), el nanoanticuerpo sería capaz de entrar con mayor facilidad en el bolsillo flagelar en comparación con un anticuerpo (Stijleman y col., 2011). Por otro lado, la identificación de estas secuencias de *T. vivax*, de un aislado venezolano, podrían servir para llevar a cabo prueba de mutagénesis dirigida como los que se han hecho para otros tripanomatideos (Maga y col., 1999; Saravia y col., 2005; Abdille y col., 2008b). De esta manera se evidencia la importancia de las investigaciones realizadas sobre estas secuencias.

- ✓ Se identificaron las secuencias del TvPFR2 y la Tv_nCLH. En el caso de la TvPFR2 se obtuvo la secuencia completa de 1800 pb, mientras que para la Tv_nCLH se obtuvo una secuencia parcial de 535 pb, que hasta este momento, estas secuencias no han sido reportadas.
- ✓ El diseño de los cebadores específicos TvPFRF/TvPFRR y TvCLHF/TvCLHR permitió la amplificación del gen que codifica la proteína paraflagelar 2 y la secuencia parcial de la clatrina de un aislado venezolano de *T. vivax*.
- ✓ El diseño de cebadores internos, para las amplificaciones de la PFR2, permitieron obtener la secuencia completa del gen al hacer los alineamientos de los productos.
- ✓ Los cebadores TvPFRF/TvPFRR podrían servir para diagnosticar la presencia de *T. vivax* en el hospedador.
- ✓ A nivel de comparación de secuencias aminoacídicas se encontró que tanto PFR2 como CLH, sugieren que *T. vivax* presenta una mayor identidad con *T. cruzi* que con *T. brucei* o *T. evansi*, estos estudios apoyan la proximidad filogenética entre *T. cruzi* y *T. vivax*.

✓ Los ensayos de predicción de antigenicidad mostraron que tanto la PFR2 como la CLH poseen regiones inmunogénicas. La PFR2 presentó la mayor antigenicidad en el dominio distal, mientras que la CLH presentó mayor antigenicidad en los extremos amino y carboxi-terminal de la proteína.

- Expresar la proteína paraflagelar 2 y la secuencia parcial de la clatrina de *T. vivax* en el vector peT28a, ya que ambas proteínas se ha convertido en una diana terapéutica prometedora.
- Utilizar ambas proteínas como posible inmunoógeno en el ganado venezolano.

- Abdille, M., Yong, S., Jia, Y., Suo, X., Mkoji, G. 2008. Evidence for the existence of paraflagellar rod protein 2 (PFR2) gene in *Trypanosoma evansi* and its conservation among other kinetoplastid parasites. *Exp. Parasitol.* 118: 614-618.
- Abdille, M., Yong, S., Jia, Y., Ding, J., Suo, X. 2008. *Trypanosoma evansi*: Paraflagellar rod protein 1 and 2 are similar but lack common B cell epitopes. *Exp. Parasitol.* 120: 411-416.
- Absalon, S., Blisnick, T., Bonhivers, M., Kohl, L., Cayet, N., Toutirais, G., Buisson y col. 2008. Flagellum elongation is requiered for correct structure, orientation and function of the flagelar pocket in *Trypanosoma brucei*. J. Cell Sci. 121: 3704-3716.
- Allen, C., Gouldinh, D., Field, M. 2003. Clathrin-mediated endocytosis is essential in *Trypanosome brucei*. *EMBO J.* 22(19): 4991-5002.
- Alves, A., Madruga, C., Desquesnes, M., Soares, C., Rios, L., Gonçalves, S. 2008. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World. A Review *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 103 (1): 1-13.
- Anosa, V. 1988. Haematological and biochemical in human and animal trypanosomiasis. Part I. Revue D'elevage et de Medicine Veterinaire des pays Tropicaux. 4 (1): 65-78.

- Bastin, P., Matthews, K., Gull, K. 1996. The paraflagellar rod of kinetoplastida: Solved and Unsolved Questions. *Parasitol Today*. 12 (8): 302-307.
- Bastin, P., Sherwin, T., Gull, K. 1998. Paraflagellar rod is vital for trypanosome mobility. *Nature*. 391: 548.
- Bastin, P., Pullen, T., Moreira-Leite, F., Gull, K. 2000. Inside and outside of the trypanosome flagellum: a multifunctional organelle. *Microbes Infect.* 2: 1865-1874.
- Borst, P., Fairlamb, A. 1998. Surface receptors and transporters of *Trypanosoma brucei*. Annu Rev Microbiol. 52: 745-78.
- Branche, C., Kohl, L., Toutirais, G., Buisson, J., Cosson, J., Bastian, P. 2006.
 Conserved and specific functions of axoneme components in trypanosome motility. *J. Cell Sci.* 119: 3443-3455.
- Brener, Z., Andrade, Z. 1979. Relações hospedeiro-parasito. In *Trypanosoma cruzi e doenca de Chagas*. 1-41. Editorial Guanabara Koogan, Río de Janeriro, Brasil.
- Brennand, A., Gualdrón-López., M., Coppens, I., Rigden, D., Ginger, M., Michels, P. 2011. Autophagy in parasitic protist: Unique features and drug targets. *Mol. Biochem. Parasitol.* 177: 83–99.
- Broadhead, R., Dawe, H.R., Farr, H., Griffths, S., Hart, S.R., Portman, N., Shaw, M.K y col. 2006. Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome. *Nature*. 440: 224–227.

- Clark, K., April, K., Gennadiy, K.S., Lal, S., Stryker, A.G., 2005. Cloning and expression analysis of two novel paraflagellar rod domain genes in *Trypanosoma cruzi. Parasitol Research.* 96: 312–320.
- 16. Coppens I, Opperdoes FR, Courtoy PJ, Baudhuin P. 1987. Receptor-mediated endocytosis in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *J Protozool.* 34 (4): 465-73.
- Correa, J., Menna-Barreto, R., Soares, M. 2007. Clathrin in *Trypanosoma cruzi*: In Silico Gene Identification, Isolation, and Localization of Protein Expression Sites. *J Eukaryot Microbiol.* 54(3): 297-301.
- Curasson, M. 1943. *Trypanosoma vivax* et varieties. Editorial M. G Curasson. Tomo I. Vigot Freres, Paris.
- Dávila, A., Silva. 2000. Animal trypanosomiasis in South America. Current status, partnership, and information technology. *Ann. N. y Acad. Sci.* 916: 199-212.
- 20. Deflorin, J., Rudolf, M., Seebeck, T. 1994. The major components of the paraflagellar rod of Trypanosoma brucei are two similar but distinct proteins which are encoded by two different gene loci. *J. Biol. Chem.* **269**: 28745-28751.
- 21. De Souza, W., Souto-Padron, T. 1980. The paraxial structure of the flagellum of trypanosomatidae. *J. Parasitol.* **66:** 229–236.
- De Souza., W. 2002. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanososmatids: dreams and reality. *Kinetoplastid Biol Dis.* 1 (1): 3.

- De Stefano, H., González, B., Boada-Sucre, A., Avellaneda, A., Godoy, S., Soto, H. 1999. Efecto de la infección con *Trypanosoma vivax* sobre la calidad espermática de toros Siboney. *Rev. Cient.* FCV-LUZ. 9(5): 411-417.
- 24. Desquesnes M. 2004. Livestock Trypanosomoses and Their Vectors in Latin America. World Organization for Animal Health. Paris, Francia.
- Docampo, R., De Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P. y Moreno, S. 2005.
 Acidocalcisomes-conserved from bacteria to man. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 251-261.
- Duszenko, M., Ivanov., IE., Ferguson., M., Plesken, H., Cross, G. 1988. Intracellular transport of a variant surface glycoprotein in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Biol.* 106: 77-86.
- Espinoza, E., Aso, P., González, N., Rangel, L. 1996. Clasificación morfológica de la anemia desarrollada en bovinos infectados experimentalmente con *Trypanosoma vivax*. *Vet Trop.* 21 (2): 201-214.
- Field, M., Carrington, M. 2009. The trypanosome flagellar pocket. *Nature Review*. 7: 775-786.
- 29. Fuge, H. 1969. Electron microspic studies on the intraflagellar structures of trypanosomes. *J. Protozool.* **16:** 460- 466.
- Gadelha, C. Rothery, S., Morphew, M., McIntosh, J., Severs, N., Gull, K. 2009. Membrane domains and flagellar pocket boundaries are influenced by the cytoskeleton in African trypanosomes. *PNAS*. **106** (**41**): 17425–17430.
- 31. Gardiner, C., Fayer, R., Dubey, J. 1989. An atlas of protozoan parasites in animal tissues. *Agriculture Handbook*. **651**: 70-71.

- 32. Goméz, E. 2011. Caracterización clínica, morfométrica y molecular de aislados venezolanos de *Trypanosoma vivax*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela.
- Gonzales, J.L., Chacón, E., Miranda, M., Loza, A., Siles, L. 2007. Bovine trypanosomosis in the Bolivian Pantanal. *Vet parasitol.* 146: 9-16.
- 34. González, L.E., García, J.A., Núñez, C., Perrone, T.M., González-Baradat, B., Gonzatti, M.I., Reyna-Bello, A. 2005. *Trypanosoma vivax*: A novel method for purification from experimentally infected sheep blood. *Exp. Parasitol.* **111**: 126-129.
- Grab, D., Bwayo, J. 1982. Isopycnic isolation of African trypanosomes on Percoll gradients in situ. *Acta Trop.* 39: 363-366.
- Hirst, J., Robinson, M. 1998. Clathrin and adaptors. *Biochim. Biophys.* 1404: 173-193.
- Hoare, C. A. 1972. The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph. Blackwell Scien Publ. 555-592.
- Hofmann, H., Hädge, D. 1987. On the theoretical prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Biomed Biochim Acta*. 46 (11): 855-66.
- Hung, C., Qiao, X., Lee, P., Lee, M.G. 2004.Clathrin-Dependent Targeting of Receptors to the Flagellar Pocket of Procyclic-Form *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell.* 3(4): 1004–1014.
- Kirchhausen, T. 1999. Adaptors for clathrin-mediated traffic. Annu Rev Cell Dev Biol. 15: 705-732.

- 41. Kirchhausen, T. 2000. Clathrin. Annu. Rev. Cell. Biochem. 69: 699-727.
- 42. Kornberg, A. 1995. Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. *J. Bacteriol.* **177**: 491- 496.
- Kumar, S., Natesan, A., Black, A., Matthews, A., Mottram, J., Field, M. 2011. *Trypanosoma brucei brucei*: Endocytic recycling is important for mouse infectivity. *Exp. Parasitol.* 127 (4): 777-783.
- Lacomble, S., Portman, N., Gull, K. 2009. A protein-protein Interaction Map of the *Trypanosoma brucei brucei* Paraflagellar Rod. *Plos One*. 4 (11): e7685.
- Ladon, L., Santrich, C., LeBrowitz, J. 1996. Stage-specific expression of the Leishmania mexicana paraflagellar rod protein PFR-2. Mol. Biochem parasitol.
 80: 125-132.
- 46. Landfear, S., Ignatushchenko, M. 2001. The flagellum and flagelar pocket of trypanosomatids. *Mol. Biochem Parasitol.* **115:** 1-17.
- 47. Levine, N., Corliss, J., Cox, F., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B., Leedale, G y col. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *J Parasitol.* 27 (1): 37-28.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J.
 2002. Biología Celular y Molecular. Editorial panamericana, Cuarta Edición.
- Luque, J., Herráez, A. 2008. Biología Molecular e Ingeniería Genética.
 Editoria Elsevier, Madrid, España.
- Maga, J., Sherwin, T., Francis, s., Gull, K., LeBowitz, J. 1999. Genetic dissection of the *Leishmania* paraflagellar rod, a unique flagellar cytoskeleton structure. *J. Cell Sci.* 112: 2753-2763.

- McKean, P.G., Baines, A., Vaughan, S., Gull, K., 2003. Gamma-tubulin functions in the nucleation of a discrete subset of microtubules in the eukaryotic flagellum. *Curr. Biol.* 13: 598–602.
- McPherson, M., Moller, S. 2006. PCR. Segunda edición. The Basic. Cornwall, UK.
- Michels, P., Hannaert, V., Bringaud, F. 2000. Metabolic Aspects of Glycosomes in Trypanosomatidae – New Data and Views. *Parasitol Today*. 16 (11): 482-489.
- Miranda, G., Esdras, D., Miranda, K., Weissmuller, G., Mascarello, P., De Souza, W. 2010. Structural Changes of the Paraflagellar Rod during Flagellar Beating in *Trypanosoma cruzi*. *PloS one*. 5 (6): e11407.
- Moore, L., Santrich, C., LeBowitz, J. 1996. Stage-specific expression of the Leishmania mexicana paraflagellar rod protein PFR-2. Mol. Biochem. Parasitol.
 80: 125-135.
- 56. Morell, M., García-Perez, JL., Thomas, MC., Lopéz, MC. 2005. Silico identification, molecular characterization and expression analysis of the *Trypanosoma brucei* paraflagellar rod protein PFR3. *Ars Pharm.* 46 (1): 73-84.
- 57. Morgan, G., Allen, C., Jeffries, T., Hollinshead, M., Field, M. 2001. Developmental and morphological regulation of clathrin-mediated endocytosis in *Trypanosoma brucei*. J. Cell Sci. 114: 2605-2615.
- 58. Morgan, G., Hall, B., Denny, P., Carrington, M., Field, M, 2002. The kinetoplastida endocytic apparatus. Part I: a dynamic system for nutrition and evasion of host defences. *TRENDS in Parasitol.* 18: 491-496.

- Mousavi, S, Malerod, L., Berg, T., Kjeken, R. 2004. Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem. J.* 377: 1–16.
- Osório, A., Madruga, C., Desquesnes, M., Soares, C., Ribeiro, L., Costa, S. 2008. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World. A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 103 (1): 1-13.
- 61. Overath, P., Engstler, M. 2004. Endocytosis, membrane recycling and sorting of GPI-anchored proteins: *Trypanosoma brucei* as a model system. *Mol Microbiol*. 53 (3): 735-44.
- 62. Owen, D., Luzio, J.P. 2000. Structural insights into clathrin-mediated endocytocis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**: 467-474.
- 63. St. Pierre, C., Leonard, D., Corvera, S., Kurt-Jones, E., Finberg, R. 2011. Antibodies to cell surface proteins redirect intracellular trafficking pathways. *Exp Mol Pathol.* **91:** 723-732.
- 64. Portman, N., Gull, K. 2010. The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: From structure to components and function. *Int J. Parasitol.* **40** (2): 135-148.
- 65. Reyna, A. 2007. Estado actual de la tripanosomosis y anaplasmosis a partir de muestras realizadas en 4 estados de Venezuela. *Boletín de Malariología y salud ambiental*. XLVII. Sup (1): 76.
- 66. Rivera, M. 1996. Hemoparasitosis bovina. Caracas. Universidad Central de Venezuela.

- 67. Sandoval, E., Espinoza, E., Valle, A. 1995. Parasitemia y comportamiento clínico en ovejas infectadas experimentalmente con *Trypanosoma vivax*. Vet *Trop.* 20: 67-84
- Santrich, C., Moore, L., Sherwin, T., Bastin, P., Brokaw, C., Gull, K., LeBowitz, J.H. 1997. A motility function for the paraflagellar rod of *Leishmania* parasites revealed by *PFR-2* gene knockouts. *Mol. Biochem Parasitol.* **90** (1): 95-109.
- Saravia, N., Hazbon, N., Osorio, Y., Valderrama, L., Walker, J., Santrich, C., Cortazar, T., LeBowitz, J., Travia, B. 2005. Protective immunogenicity of the paraflagellar rod protein 2 of *Leishmania mexicana*. *Vaccine*. 23: 984–995
- 70. Schlaeppi, K., Deflorin, J., Seebeck, T. 1989. The major component of the Paraflagellar Rod *Trypanosoma brucei* is a helical protein that is encoded by two identical, tandemly linked genes. *Cell Bio.* 109: 1695-1709.
- 71. Seidl, A., Davila, A., Silva, R. 1999. Estimated Financial Impact of *Trypanosoma vivax* on the Brazilian Pantanal and Bolivian Lowlands. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94: (2).
- 72. Simoes, D., Sánchez, M., González, Y., Rivera, F., Parra, R., Gil, M., García, M., y col. 2009. Brote de tripanosomosis en un rebaño doble propósito del municipio Mara del estado Zulia, Venezuela. Ciencia. 17 (2): 124 132.
- Souza, W., Souto-Padrón, T. 1980. The paraxial structure of the flagellum of tripanosomatidae. J. Parasitol. 66 (2): 229- 235.

- 74. Stijlemans, B., Caljon, G., Natesan, S., Saerens, D., Conrath, K. 2011. High Affinity Nanobodies against the *Trypanosome brucei* VSG Are Potent Trypanolytic Agents that Block Endocytosis. *PLoS Pathog.* 7(6): 1002072.
- 75. Suarez, C., García, F., Baldizán, G., Mujica, F. 2003. Comportamiento parasitológico, clínico y hematológico en ovinos infectados experimentalmente con un aislado venezolano de *Trypanosoma vivax*. *Vet trop.* **28** (1): 79-92.
- 76. Tafur, M., Amanda, C., Casas, A., Serrano, E. 2002. Prevalencia de *Trypanosoma vivax* en bovinos de selva alta en la provincia de Chachapoyas, Amazonas. *Rev. Inv. Vet.* 13 (2): 94-97.
- 77. Tamasaukas, R., Roa, N., Cobo, M. 2006. Trypanosomosis por *Trypanosoma vivax* en búfalos, en dos fincas del estado Guárico, Venezuela. *Rev Científica*, FCV-LUZ. 16 (6): 575-578.
- 78. Tejera, E. 1920. Tripanosomiasis animales en Venezuela. *Bull. Soc. Path. Exot.*13: 297-305.
- Toro, M., León, E. García, J., Ruiz, A. 1980. Resultados de un muestreo sobre tripanosomiasis bovina mediante técnicas serológicas. *Vet. Trop.* 5 (1): 43-50.
- 80. Toro, M. 1990. Seroepidemiología de las hemoparasitosis en Venezuela. Curso de ampliación de conocimientos sibre técnicas de inmunodiagnóstico de enfermedades causadas por hemoparásitos. Universidad Simón Bolivar/ Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela.
- Vanhamme, L., Pays, E. 1995. Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol Rev.* 59: 223-240.

- Vaughan, S., Gull, K. 2003. The trypanosome flagellum. *Cell Science*. 116: 757-759.
- Vickerman, K., 1962. The mechanism of cyclical development in trypanosomes of the *Trypanosoma brucei* sub-group: An hypothesis based on ultrastructural observations. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 56: 487–495.
- Vickerman, K. 1974. Antigenic variation in African trypanosomes. In parasites in the immunized Host: Mechanism of Survival, Ciba Foundation Symposium. *Asocciated Scientific Publishers*. 25: 53-70.
- Wakeham, D., Chen, C., Greene, B., Hwang, PK., Brodsky, FM. 2003. Clathrin self-assembly involves coordinated weak interactions favorable for cellular regulation. *EMBO J.* 22 (19): 4980–4990.
- Wells, E. 1984. Animal trypanosomosis in South America. *Rev. Vet. Med.* 2: 31-41.
- 87. Wiley y Sons. 1987. Current Protocols in Molecular Biology. Editorial Office.
- Willox, A., Royle, S.J. 2012. Functional analysis of interaction sites on the Nterminal domain of clathrin heavy chain. *Traffic.* 13: 70-81.
- Woodward R, Cardewn MJ, Gull K. 1994. Molecular characterization of a novel, repetitive protein of the paraflagellar rod in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 67: 31-39.
- Xing, Y., Böcking, T., Wolf, M., Grigorieff, N., Kirchhausen, T., Harrison, S.
 2010. Structure of clathrin coat with bound Hsc70 and auxilin: mechanism of Hsc70-facilitated disassembly. *EMBO J.* 29: 655 – 665.

9.1 CONSULTAS EN LÍNEA:

- 1. http://www.genedb.org. [Consulta: 24-03-2011].
- 2. http://tritrypdb.org/tritrypdb/ [Consulta: 14-03-2011].
- 3. http://www.ivic.gob.ve/microbiologia/cesaan/# [Consulta: 15-03-2011].
- 4. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed [Consulta: 10-01-2011].
- 5. http://www.sanger.ac.uk/ [Consulta: 10-01-2011].
- 6. http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php [Consulta: 26-04-2011].
- 7. http://expasy.org/sprot/ [Consulta: 26-04-2011].
- 8. http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/ [Consulta: 11-08-2011].
- 9. http://www.ch.embnet.org/cgi-bin/TMPRED_form_parser [Consulta: 11-02-2012].
- 10. MEGA 4.
- 11. OLIGOEXPLORER 1.2.
- 12. DNACLUB.

Anexo 1. Árbol filogenético de la secuencia de la proteína PFR2, descrito por Abdille y colaboradores (2008b).



Anexo 2. Se observa en color rojo la secuencia parcial putativa de la CLH de la región N-terminal. Esta secuencia se ubica en la posición 504 pb hasta la 1039 pb en relación a la secuencia completa de la CLH, presentando un 100 % de homología con el fragmento equivalente en la CLH putativa.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
CLHcompleta CLHparcial Consensus	АТССАС	CGGCCCTATA	TCCTTTGCCG	AAGTTTTCCA	IGCTCAACTC	TGTTGCTGGGG	GTTTGCAAC	CGGGTGCTAT	ATCCTTTAAF	ACGCTCACG	TTGGAGAGCGA	TAAATATGTT	тесеттсет	GACGTTC
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
CLHcompleta CLHparcial Consensus	AGCCG0	GATGGACAGA	CTTCGCTCGT	AATCGTTGAT	CTTGAGGGG	+ Сбтбалабсат	rccgtaacaa	TGTCCGTGAT	GCGGACTCTG	CTATCATGA	ACCCCAGGTCA	AAGATTCTTG	CAATCCGAA	1 6CGGCCG
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
CLHcompleta CLHparcial Consensus	GAACCT	ГТСАБАТАТА	CGATATGGAT	GCGGCGAAGC	GCCTCAAAG	ссастасатто	GACGAGGAC	бтббттттт	GGACCTGGGT	GGATGAACG	CACCGTAGGCA	тсөтстссая	ттсббстбт	ACACCAC
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
CLHcompleta CLHparcial Consensus	TGGAGO	CTGGATGGT	TCAACGGATG	CACCACCGAA	TCGCGTCTT	TGATCGTGCAC	CTGAGCTCA	ATGGCAATGT	TCAAATTCTA	AGCTACCAA	ACTGACGAAAA	CAAGAAGTGG	TTGATGTTA TTGATGTTA TTGATGTTA	TGTGGCA TGTGGCA TGTGGCA
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
CLHcompleta CLHparcial Consensus	TATCCO TATCCO TATCCO	CGTGGGACTG CGTGGGACTG CGTGGGACTG	AGGGCACCGT AGGGCACCGT AGGGCACCGT	GGGGAAAACC GGGGAAAACC GGGGAAAACC	CAACTGTTC CAACTGTTC CAACTGTTC	AGTGTTGAAAA AGTGTTGAAAA AGTGTTGAAAA	ICAACAGCGG ICAACAGCGG ICAACAGCGG	TCGTGTTCTT TCGTGTTCTT TCGTGTTCTT	GAGGGCAACG GAGGGCAACG GAGGGCAACG	CAGGTACCT CAGGTACCT CAGGTACCT	TCATTTCCACC TCATTTCCACC TCATTTCCACC	AGTATCCCAA Agtatcccaa Agtatcccaa	CGGACCCGC CGGACCCGC CGGACCCGC	GCTCGTG GCTCGTG GCTCGTG
	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
CLHcompleta CLHparcial Consensus	CAATGI CAATGI CAATGI	IGATGTGTCT Igatgtgtgtct Igatgtgtct	TGCATGGAAC TGCATGGAAC TGCATGGAAC	AACCCGACTC AACCCGACTC AACCCGACTC	:AAGGTGGGA :AAGGTGGGA :AAGGTGGGA	AGGTGCTCATC AGGTGCTCATC AGGTGCTCATC	CATGGAACTC CATGGAACTC CATGGAACTC	CCCACAGCCC CCCACAGCCC CCCACAGCCC	CCAAAATGGA CCAAAATGGA CCAAAATGGA	CGTCTCCCT CGTCTCCCT CGTCTCCCT	TCAGCGGCGCG TCAGCGGCGCG TCAGCGGCGCG	TGGTGGACGT TGGTGGACGT TGGTGGACGT		TGCTGGG TGCTGGG TGCTGGG
	781	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
CLHcompleta CLHparcial Consensus	GACTTO GACTTO GACTTO	CCTGTTGCC CCTGTTGCC CCTGTTGCC	TTGCACGTTT TTGCACGTTT TTGCACGTTT	CTCCACGACA CTCCACGACA CTCCACGACA	ICAAACTATT ICAAACTATT ICAAACTATT	GACTGTCGTGA Gactgtcgtga Gactgtcgtga	ICGGGCCATG ICGGGCCATG ICGGGCCATG	GAAGCCTTCT GAAGCCTTCT GAAGCCTTCT	ACTCATGGAT ACTCATGGAT ACTCATGGAT	ATCTTCACG ATCTTCACG ATCTTCACG	GCAGTTGTGAT GCAGTTGTGAT GCAGTTGTGAT	TAAGACACAG TAAGACACAG TAAGACACAG	CAGGTAAGC CAGGTAAGC CAGGTAAGC	AATTGCG AATTGCG AATTGCG
	911	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
CLHcompleta CLHparcial Consensus	GTGTCT GTGTCT GTGTCT	ITCTGTGGGA ITCTGTGGGA ITCTGTGGGA	CAGGCTACAC CAGGCTACAC CAGGCTACAC	TAAGACAGGA TAAGACAGGA TAAGACAGGA	IGGCATTCTG IGGCATTCTG IGGCATTCTG	TGCGTCAATGC TGCGTCAATGC TGCGTCAATGC	CCAGGGTTC CCAGGGTTC CCAGGGTTC	CGTCTTCCAC CGTCTTCCAC CGTCTTCCAC	GTCTCTCCTF GTCTCTCCTF GTCTCTCCTF	ACGACAATG ACGACAATG ACGACAATG	CTATTGTTCCG CTATTGTTCCG CTATTGTTCCG	TTTGTAAAAA TTTGTAAAAAA TTTGTAAAAAA	ATCAGCTAC ATCAGCTAC ATCAGCTAC	AGAACCC AGAACC AGAACC
	1041	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
CLHcompleta CLHparcial Consensus	CGAGCT	TGCACTTCG	CATTGCTGGT	тстбссаасс	TGGGCGGTG	TGGATGACCTT	TATCGGGTA	AAATTGGAAA	ACAGTCTTCG	TGCTGGCGA	TGTGGAGGAGG	CCGTGCGCAC	GTGTTTGCG	төссссс
	1171	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
CLHcompleta CLHparcial Consensus	1 AACAA1	ГОСАТТОСОТ	GTGCCAGAAG	TGCTCAACCG	ATTTGTGCA	CATGCCTCAGA	тестесто	AGCAACCGGC		TACTTTAAG	ATAGTACTCGC	AGAGACGTCC	CTCAACAAG	CACGAAT
	1301	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430
CLHcompleta CLHparcial Consensus	стата	GAGCTTGCCC	GTGCAATTCT	CCCTAAGGGT	GGCATCAAT	ТАССТСААСТ	IGCAGTATGA	CGAGGACAAA	ITTGACGCCGT	CGGAGGAGC	TAGGAGACCTC	ATTTCCCAAG	TAGACCCGG	i Agcttgc
	1431	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560
CLHcompleta CLHparcial Consensus	ACTCAR	адататтсса	СААААССААТ	GCCCATGCAA	IGAGTAGTCA	ACGTCTTGCTT	CAGCGCAAT	GAGACACAAA	IAGGCTGTGGA	GTATTGCAA	GCGGGGCTGGCT	TTTCCCCCAR	CTGGCGTGA	1 Таттстб
	1561	1570	1580	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690
CLHcompleta CLHparcial Consensus	1 AACAG1	TTCATTCAC	GTTAACCCAC	AGAACGCCGT	TGGACTTGC	сстбатбстто	CACCGCGATT	TAGCGGAAAA	ACCCGTACTO	CCGCCAAAC	GAGATTGTGGA	CATGTTCGTG	ACTGCCCAG	стбатсс
	1691	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800	1810	1820
CLHcompleta CLHparcial Consensus	AACAAC	SCAACTGAGT	TCATCCTTGA	AGTTCTGCGT	GGTGACAGT	+ AGTGAGGCGAC	GAGCGACCT	CCAAACGAAG	ATACTTGAAA	ТАААТСТТА	AGCACTCGCAT	тсстсбатта	CGGAAAAAA	ттттбс
	1821	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940	1950
CLHcompleta CLHparcial Consensus	1 TTGTGC	SCATCTGCAC	ACACTATGAT	ботатостст	теессстт	төтөтбабсөт	GCCGGCCTT	CCTCAGCGCG	CCATTGAATG	TTATGTGAC	AGCGCAACGCC	АGGATCCTGG	CATTGACAA	сстсест
	1951	1960	1970	1980	1990	2000	2010	2020	2030	2040	2050	2060	2070	2080
CLHcompleta CLHparcial Consensus	AACAT1	rcgtcgctgc	TTCTCGCATG	CTCATAATTT	CAATCCGGA	GTGGGTCATGG	AGTTCTTCG	GGAAGCTCAG	TCAGACAGAC	AGCATGAAG	TGCTTGGAGGA	TCTTTTGCGT	ААТСАТСАТ	

	2081	2090	2100	2110	2120	2130	2140	2150	2160	2170	2180	2190	2200	2210
CLHcompleta	TCAAG	GTTATTGTT	CAGCTAGCCA	CTAAGTACAAG	GATGCACTT	GGCTCCGATA	ACTTATTGA	ACTGTTTCTG	GAGCACAAAC	FGTACGACAT	TTGTATTAC	TACCTTGGCG	CATCGTTCC	GTACAC
CLHparcial Consensus														
	2211	2220	2230	2240	2250	2260	2270	2280	2290	2300	2310	2320	2330	2340
filleenn let a		отссососс:	+	+	+	+			+			+		
CLHparcial	ccura	machanaa	raciie inicea	crimicana	Icaaccacca	ndarradeen	aracinana		Tancheartan		meanreeea	nacaancach	Incacificita	
Lonsensus								••••••••••••						·····
	2341	2350	2360	2370	2380	2390	2400	2410	2420	2430 +	2440	2450	2460	2470 1
CLHcompleta CLHparcial Consensus	AAGAA	AATGGCCGA		CTTATCAATA1	ICTGCGACCA	GCACAACTTC	ATTGACGACC	TTGTTCGGTA	CCTCATCGAA	1CAAGAAATGI	AAAGCCTCAT		TGCAACGGC	GCAGTC •••••
	2471	2480	2490	2500	2510	2520	2530	2540	2550	2560	2570	2580	2590	2600
CLHcompleta CLHparcial Consensus	CTTCR	AAGACACCC	GCCGTTGTGG	GTGCGTTGATI	rgactgcaac	GTCCAGGAAG	CTTTCATCAA	GAGCCTTCTT	стттствтсв	STACTATGTG	CCCGTGGCT	GAGTTGGTTG	IGGTGGTGGA	1 ACAGCG
	2601	2610	2620	2630	2640	2650	2660	2670	2690	9690	2700	2710	9790	9720
CI II . 1 .	1	+	+	+		+			+			+		
CLHcompieca CLHparcial Consensus								·····				••••••		••••••
	2731	2740	2750	2760	2770	2780	2790	2800	2810	2820	2830	2840	2850	2860
CLHcompleta	GAAAA	CGAGTATTA	CAATCCTCTT	GTTATTGGCAR	AGTACTGCGA	GAACCGTGAC	CTCACCTGT	CCTACATTGC	GTATCGCCGT	GTTGCTTGA	GCAATGAACT	GATTGAAATTI	CATCGAAGA	ATGGAA
CLHparcial Consensus														
	2861	2870	2880	2890	2900	2910	2920	2930	2940	2950	2960	2970	2980	2990
fillcompleta	1	+		+					1770277002	+	 anaaqanta1		+	
CLHparcial	Turuu	minerineria		Tratechacha			chedaraer		aanneancea	Tanchanch				
Lonsensus	•••••			•••••				•••••						•••••
	2991	3000	3010	3020	3030	3040 +	3050	3060	3070	3080	3090	3100 +	3110	3120
CLHcompleta CLHparcial Consensus	CGAGG	TAACGGAAG	AGGTGAGCAC	CACGGTACGTO	SCCTTCATGA	ATGCTGAACT	raccgaggag	TTGGTTTCAA		GATTGTTGTG	IGTGGTCGCT	TTAGGAAGAA		GAGAAC
	3121	3130	3140	3150	3160	3170	3180	3190	3200	3210	3220	3230	3240	3250
CLHcompleta CLHparcial	I стсст	TATAATGTC	GGCGGTGCGC	TCGCGCAAGAA	ICAAGGTGAT	GGAATACGTT	ICCACACTGG	AGAACTACGA	CGCGAAGGAA	STCGCGGGTA	ICTGCTCCAG	TGAGGGAATG	TTGAGGCGG	I Cgttta
Consensus	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••
	3251	3260	3270	3280	3290	3300	3310	3320	3330	3340	3350	3360	3370	3380
CLHcompleta CLHparcial Consensus	ĊAGTG	TACGACAAA	TTTGAÅATGC	CGGTGGAAGCO	CGCTCGTGTG	CTTATĠCATG	ICATGAAGGA	CATTCCTCGC	GGTCGĊCTCTI	TGCACAACG	STGCGÁCATG	CCCTCCGTGT	GTCTGTACT	TGGTGÅ
	3381	3390	3400	3410	3420	3430	3440	3450	3460	3470	3480	3490	3500	3510
CLHcompleta CLHparcial	I GGCAC	TGCTTGCTG	CTGATGAGTTI	ACGCGAGGCCF	ATTGATGTTC	TGATTCGTGC	HAGAACCAC	AGCTGTGTTG	ATTCTGTAATO	CGCTGCAGCG	GAGCGTAACA	ACCAGTACGG	GACCTCATC	1 AAGTAT
consensus					0FF0		0570							
	3511	3920	3330	3340	3000	3360	3970	3380	3090	3600	3610	3620	3630	3640
CLHcompleta CLHparcial Consensus	CTCAC	GATGGTGCG	CCAGGAATCA	CACGGCGAAGF	IGAGTAAAAT	CGATACGATC	ITGGTTCTGA	CGTACGCCAG	GACGGGCCGC	ITGTCCGAGT	rggaggagtt	GCTTAAGAGT	ICCCACCATA	TCCAGG •••••
	3641	3650	3660	3670	3680	3690	3700	3710	3720	3730	3740	3750	3760	3770
CLHcompleta CLHparcial Consensus	TTCAC	ACAGTCGCC	GACAAGTGCT	TTAATGATGG1	ICTTTATGAT	TCCGCTCGTG	IGCTGTACTC	RATCTCGATG	AACTTCCACA	ACTCGCTCT	GACGTTGGTG	CGCCTTAACA	ITCTTCCGGA	1 GGCTGT
	3771	3780	3790	3800	3910	3820	3830	3840	3850	3860	3970	3880	3890	3900
CLHcompleta CLHcompleta	CGAAG	CAGCTCAAA	AGTCCCAAGC	AAGGAGCACAT	IGGGATGAGG	TCAACCTGGC	TGCGTTGAA	GCAAAGGAAA	TGAAGCTTGC	CAATATCTGT	SCGATTCCCC	TTGCGCTGCA	GTGGAGACA	I CTGCAC
Consensus	•••••	•••••	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • •	•••••	• • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • •	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • •	•••••	•••••	•••••
	3901	3910	3920	3930	3940	3950	3960	3970	3980	3990	4000	4010	4020	4030
CLHcompleta CLHparcial Consensus	GACAT	TGTGGTCCG	CTATGAGGAC	CTCGGTCTCTF	ITGACGACTT	GTTGGCGGTG	rtgaaggcag	CTGCCACCAA	TACTGGCGCT	CACATGGGTA	ICTTTACGGA	GATGGGCGTTI	ITACTÉGEAA	AATACA
	4031	4040	4050	4060	4070	4080	4090	4100	4110	4120	4130	4140	4150	4160
CI II	4031		4030	4000	4070	4000 +	4030	4100	4110 +	4120	4130 +	4140 +	4130	
CLHparcial CLHparcial Consensus	antt	••••••		•••••••••••		••••••						••••••		
	4161	4170	4180	4190	4200	4210	4220	4230	4240	4250	4260	4270	4280	429 0
CLHcompleta	GCTCG	CCGCTGCGA	AGACAATGAT	GCATCACTTT	GAGATGCGT	GGGATCACGA	GTGTTCAAG	GAGGTTGCTT	GTCACCTCGG	GCCAGTGAT	GTTGTCTACA	GTTCCATCTC	TTTTACCTG	aatacg
CLHparcial Consensus												•••••		•••••

	4291	4300	4310	4320	4330	4340	4350	4360	4370	4380	4390	4400	4410	4420
CLHcompleta CLHparcial Consensus	Астсо	CCAGCTTCT	rcaggacctgo	TGTCAAGCTI	IGTTCAAAAC	TCTGGACCCAG	AGCGCGTTC1	GCGCGAGGT	AAAGCCGTCG	CCTCTGTTCF	ICCTCATCCA	CAGTATCTTG	AGACGGTGCAC	SAACC
	4421	4430	4440	4450	4460	4470	4480	4490	4500	4510	4520	4530	4540	4550
CLHcompleta CLHparcial Consensus	GAAAT	GCTAAACTGA	ITCAATGAGGO	CCTGAACGAC	TTCTACGTT	GAGGAGGAGAF	ICTTCACTGCI	CTTCGCCAT	CCGTAGAGAA	статаатаас	TTTGATTCA	SCCGAGCTGAC	CGCAAAGTTGO	58888
	4551	4560	4570	4580	4590	4600	4610	4620	4630	4640	4650	4660	4670	4680
CLHcompleta CLHparcial Consensus	Г GATGO	AGCTTCTCG	ATTCCGCAAF	ATTGCTCTCT	тссттсятс	GACGCAACAAF	AGCTATGCG	ATGCGATGA	TGTGGCGAAG	GAAAGCAAGC	TATATCAGG	AGCCATTGAG	ACTGCGGCGGF	IGAGC
Consensus	4681	4690	4700	4710	4720	4730	4740	4750	4760	4770	4780	4790	4800	4810
CLHcompleta CLHparcial Consensus	AAAGF	ITATCTCAGT	FGTGGÅÅGÅTT	TGCTGGACTI	тттсөттөт	GGACCACCCTO	AGTOCTTCG	TACGTGCCTO	ТАТСТТТССТ	ACGACCTCCI	CACACCTCA	ATTGGTGCTCG	AGAAGGCATGO	астса
	4811	4820	4830	4840	4850	4860	4870	4880	4890	4900	4910	4920	4930	4940
CLHcompleta CLHparcial Consensus	ACAA6	TGCATGGATI	аттассатасо	GTACCTCATI	CAGTCTATA	CAGGACTATAC	GTCACGTGT	ATTCGTATTC	AGAAAAGCAT	GTCTGAAGCO	CACGAGTCT	GGAAAGAGAC	CGAGCGTCGCF	1 16CGG
	4941	4950	4960	4970	4980	4990	5000	5010	5020	5030	5040	5050	5060	5070
CLHcompleta CLHparcial	TCAAC	CCTTCATGG	CGGGTAACGAT	CCGCTGATGA	ITCCAAGCCG	GCCCTGCGGTO	TCGGCAGCAG	CCTCCATGA	GCAATTCCAG	CAGCCAATGO	GCTACGGTA	IGCATCCTCAA	GGTGGTCATGO	CAGGT
Consensus	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • •	•••••	•••••	•••••	•••••	••••••	•••••	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • •	•••••	•••••
CLHcompleta	5071 GGAGC	5080 ACTGTACGG	5090 GAATGGTGTAT	5100 TCTAR										
CLHparcial Consensus														

Anexo 3. Análisis de la secuencia del gen que codifica la PFR2 de *Leishmania brasiliense, T. brucei, T. congolense, T. evansi* y *T. vivax. L. brasiliense, T. brucei, T. congolense* y *T. evansi* presentan una identidad de 83,5%, 83,7%, 84,2% y 83,7% respectivamente con *T. vivax.*



Anexo 4. Análisis del gen que codifica la CLH de *Leishmania brasiliense, T. brucei* y *T. vivax. L. brasiliense y T. brucei* presentan una identidad de 66,9 % y de 69,1 % respectivamente con *T. vivax.*

L.brasiliense	1 10 I			40 CAACTTAACT					90 AAAATGTCACC		110 AGAAATATGT		130 I GATGTGC
T.vivax Consensus	ATGAACGGCCC ATGaActCC 131 140	CTTGACGACAGO cttaac.tCtgo 150	TGAGGTTTTC gGAGGTcTTL 160	CAGTTGAAT CAGTTGAAT CAact.AAc 170		190 190 190 190 190 190 190	CCCGGGACAF CCgGG.aCcf 200		AGACATTGACE AgAca.TgACg 220	TTGGAGAGAGCG TTggAGAGCG 230	ACAAGTATGT Acaagtalgt		64TGTGC 64TGTGC 64TGTGC 260
L.brasiliense T.brucei T.vivax	AGGAGGACGGG AACCTGATGGT AGCCGGATGGG	CAGACATCACTO CARACCTCTCTT CAGACGTCACTT	GTCATCGTTG GTTATCGTGG GTCATCGTGG	ATATCGAGA ATCTCGGGA ACTTGGAGA	IGCGTGAGAGC IGCGCGGAGAGC IACGTGAGAGAGT	ATTCGAAACF ATGCGCAACF ATGCGGAACF	ACGTCAAGG GTATACGTG ACATTCGCG	TGCGGAGTC TGCGGAGTC TGCGGAGTC	GTGTATTATGA AGCCATCATGA GGCCATAATGA	ACCCCAGGTC ATCCTATGGC ACCCCAAGTC	GAAAATCCTG AAAGATTCTT AAAGATCCTT	GCGCTCCGCA GCACTCCGCA GCGCTCCGCA	GTGGTCG GCGGCCG GTGGTCG
	261 270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
L.Drasiliense T.brucei T.vivax Consensus	CAACTTGCAGA TAATTTGCAAG cAActTGCAgg	TATTCGACGTGG TCTTTGACGTGG T.TTCGACGTGG	ACGCCGCCTAA ACGCCGCCCAA ATTGCCGCCGAA ia.GCcgCgaa	HLGTLTCHH TCGTCTCAA GAGGCTTAA •CGLCTCAA	GTGGTTGTGT GTGGTTTTGT GTGGTTTTGT GtGgtt.TgT	TCAACGAGGA TTTCCGAGGA TTTCCGAGGA TC.aCGAgGA	ICGTCGTCCTAT ICGTCGTCCTAT ITGTCGTCCCAT ICGTCGTCCCAT	TGGTGTTGG TGGCGCTGG TGG_GCTGG	ATTGATGCTCC GTCGATGATCC GTCGALGALCC	CACTGTAGGT AACAATTGGG AACAATTGGG	ATCGTCTCTA ATCGTCTCTA TTGGTGTCCG aT.GTgtC.g	GCACTGCGGT g.Ac.GC.GT	TATCAC TATCAC TACCAC TACCAC
L.brasiliense T.brucei	391 400 I TGGAGCCTCGA TGGAGTCTGGA		420 CGACGCGCCG		440 TCGACCGCAG		460 GACAGCTCCC			490 AGCGACGAGC ACAGATGAGC	500 AGAAGAAGTG AGAAGAAGTG		520
T.vivax Consensus	TGGAGCCTGGA TGGAGcCTgGA	CTCTGCGGAGGF c.c.GC.GccGF 540	ITGCCGCGCCCG ILGccgCgCCCG	GAGCGTGTC caGcgTC	FTTGAGCGCGCG FTcgagCGcgcl 570	CCCGGACATE CCCgGACtt.	GGCGCATCG GaCgccTCgg 590	TACAGATAC T.CAGgT.C	TGAACTACTGO T.a.TACcgo E10	ACTGACGAGA Ac,GAcGAGc	AGAAGAAGTG AGAAGAAGTG E20	GTTGTTGTTG GLTg,Tg,Tg 640	CCCCCTC CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
L.brasiliense T.brucei T.vivax	TAGCCCGCGACT TATGCGAACT		ATGGTGGGCA ATGGTGGGCA ATGGTGGGGA	AGGCGTTGC AAACACAAC AGACACAAC	ICTTCAGCGTTC	GAGAACCGCF GAGAACCAATF GAGAATCGTF		ICCTTGACGG			CACCCCCACC		TCGCAA CACGCTC
Consensus	T.gcgCGag 651 660	gCagaGGGt 670	ATGGTGGG . A 680	AgaCacaaC 690	r <mark>gTaCAGCGT.(</mark> 700	GAgAAccgta 710	720	r <mark>gcttGAcGG</mark> 730	tCAcgcggG.a	CATTCATETC 750	cACcaacACc 760	CCgaCcGA.cl 770	C.CGc.c 780
L.brasiliense T.brucei T.vivax Consensus	GTGTAACGTGA ATGCAATTTGA ATGCAACATCA aTGCAACATCA	TGTGCCTTGCCT TGTGCCTCGCTT TGTGCCTCGCCT TGTGCCTCGCCT	GGAACAGTCC GGAACAACCC GGAACACCCC GGAACACCCC	GCAGCAGGG CTCCACAGG GCACGAAGG gCac.aaGG	CGGCCAGGTCA TGGGAAAATTT TGGCAAAGTGCA GGCAAAGTGCA	TGATCATGGE TGATCATGGE AGTTCATGGE GATCATGGE	GTTGCCGACC GCTTCCTACF ACTTCCCACC	GGCTCCAAG GGATCCAAA GGCCCCCAAG GCCCCCAAG	ACAGATTTGTC ACGGATCTCAC ATGGATATCAC ACGGAT, TCAC	GTTGCCACGG AGTTCAGCGC AATGCCCCGC	CGGATTTACA CGTATGATCG CGGGTGGTGG CGgaTg,tcg	ACCTGCGCAT ATGTCCCCTT ATGTCGCATTI AtgTcccctT	TCAACCC TGCTCAG CCCACCT
L bracilience	781 790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
T.brucei T.vivax Consensus	GGTGACTTTCC GGCGACTTTCC GGCGACTTLCC	CGTTGCGACACF AGTCGCCCTGAC aGTcGCcatgca	CGTCTCACCA CGTTTCCCCC CGTcTC.ccc	CGACACAAAA CGGCACAAAG CG.CACAAg	TCCTCACCGTT TGCTGACAATO TgcTgACcgT.	GTGACAAGO CATGACAAGO gTGACAAGO	CGTGGTAGCC CGTGGAACCC CGTGG.AcCc	TGGTGCTTA CCATCTTGA st.gtgtTgA	TGGACCTCTTC TGGATATATT TGGAcaTcTTt	ACTGGAGTGG ACCGGCACCA ACCGGagtca	TCATTAAGAC TCATTCAATC TCATt.ac	TCACCAACTT TCAACAGGTG LCA.CAg.T.	CCAAACA ACACCCCA ACACCCCA
L.brasiliense	911 920 I		940 GACAACAAGG	950 TTGGCGGTG CTGGTGGTA		970 ACCACCAGO ACCACCAGO		990 FGCGCATCGG	1000 CCCGAACGACF	1010 HIGCGGCATCAT	1020 CAACTATATAT	1030 AAGAACAACA BABBAACCAACA	1040
T.vivax Consensus	ATATCGTTTTC	TGTGGGGACCTTE LGLGGgaCa	TACACAAAAA LACAc.AAga	CGGGTGGAC1	ICCTTTGTGTCF ICCTgTGCGTCF	ACAACCAAC		TCATGTTTC	CCCARATGACF	ATGGAATCAT atgg.ATCaT		AAGGATCAAA AAgaAccAaa	rgagaaa rgcaaaa
L.brasiliense T.brucei	1041 1050 	CTCTGCGCATCO CCCTTCGCATTO		1080 GAACCTCGG(TAACCTGGG	1090 GGTGTCGATG GGTGTGGATG	ACCTCTTCAP		II20 GACAACTAC GATAACCAG		1140 CAACATCGAG GAACATAGAA	GAGGCCACCC GAGGCCGCTGC		1170 GCGCGCC CGTGCA
T₊vivax Consensus	CCCGGAGCTTG ccCtGAgCTgG 1171 1180	CCGTACGTATCE CccT.CGcATcC 1190	CCAGCTCTGC CC.gCtCtGC 1200	TAACTTGGG LAACcTgGG 1210	IGGCGTTGATG IGGCGT.GATG 1220	ATCTCTATCO AcCTcTacag 1230	CATGCAATTE **gTgCAgcTE 1240	GAGAACGGT GA.AAC.a. 1250	CTTCGTGTAGE CTLCGLgLLGE 1260	GAATATTGAA igAAcAT.GAa 1270	GAAGCCATTC GAgGCcat.C 1280	GTGCCTGTCTI G.acaTGccT 1290	1300
L.brasiliense T.brucei T.vivax			TGAGATTCTC CGATATTCTT AGAAGTCCTC		TGCAAATGCCC CAACTTATGCCC					CAAGATTGTGC AAGGTGGCAG	TGGCGGAGAC TTGCCGAAAC TTGCGGAGAC	GAGCCTGAAC CACTCTTAAC GACACTGAAT	
Consensus	CC.aacAACgc 1301 1310	ctTGCGtgCo 1320	1330	1340	tgCa.atgCC 1350	2008CC	GG,CAgCcg(1370	C.GC.ATeT 1380	CgACcTACTTL 1390	AAGaTgGt.c 1400	TLGCgGAgAC 1410	gAc.CTgAAci 1420	GCGCALG 1430
L.brasiliense T.brucei T.vivax Consensus	AGTCTGTCGAA AGTCAGCAGAA AATCTGTTGAA AgTCLGL, GAA	CTTGCGCGCGCGC CTTGCCCGTGCC CTTGCACGTGCF CTTGCACGTGCF	GTEGTACCCA GTTATACCGA GTTGTCCCCA GTLgTaCCgA	AGGGTGGCA AGGGTGGTG AAGGTGGGT A2GGTGG	TGGCTACGTG CGACTACGTG CGCCTACATA CTGCCTACATA	AAGCAGCAGT AAGCAACAGT AAGCAGCAAT AAGCAGCAAT	TTGACGAGGG ATGCTGCTG ACGAGGCCAF	СПАРАСТСАС ССПАРСТАРС ПОПИСТАРС ПОПИСТАРС ПОПИСТАРС	GGCCTCGGAGG CGCCTCCGAGG GCCCAGCGAAG	AGCTCGGCGA AACTTGGTGA AGCTTGCCGA	CATGGTTCAG TCTTATGTCA TCTTTTGGCA	CAGGCGGACCI GCGGCGGACCI CAGGCCGAACCI CAGGCCGAACCI	CCAACAT CAGAGCT CAGAAAT
l brazilienze	1431 1440			1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530			1560
T.brucei T.vivax Consensus	TGCCATCAAAA GGCGATGAAGA gGCgaTgAAgA	TCTACCACAAGO TGTATTACAAGO T.TaccACaAGO	CGGAGGCACA CTGAGGCCCA C.gAgGccCA	CGCAAAGGT TGCAAAGGT cGCaAAGGT	GTTGGTGTCCT GTGAATATACT 2gT.aatgT.C1	TTTTGCAACO TTTTGCAACO T.cTgCAaCO	CAACGAGACA CAATGAGACA CAACGAgACa	CAGAAGGCT CAAAAAGCG CAgAAgGCg	GTTGAGTACTO GTGGAATATTO GTLGA&TALTO	CAAACGCGCT CAGACGGTCA CAaaCG.LC.	GGGTTCACCC AATTTCTCAC aa.TTCLC.C	CCAACTGGCG CGGATTGGCG CggAtTGGCG	GTCATC IGTCATT GTCATT GTCATC
L.brașiliense	1561 1570 + GTGAACAACTT	1580 Catccgggttg(1590 GCCACAGGAC	1600 GCCGTCAATO	1610	1620 CTCTACCG	1630 GAGATGGGCC	1640 ACAAGCCGG	1650 TGCTCAGCGCC	1660 GAGGAGATGA	1670 TGGACATGTT	1680 CGTGTCGGCC	1690
l.brucei T.vivax Consensus	TTGAATAATTT LTGAACAACLL	HATHCHCGTCH TATTCGTGTTAA .AT.Cg.GTLaa	TCCACAGAAT ACCACAGAAT	GCCGT <mark>GGGC</mark> GCCGT <mark>GAG</mark> C GCCGT <mark>gag</mark> C	CTGGCGCHHGT CTGGCACTGAT CT.gc.CtgaT	CTCCATCG CTCCATCG CTCCACCG	GACTTGGGTC GACTTGGGTC GAcaTGGG L C	GHCGCCCCAG GACACCCCAG GACacgCC.G	TAGTGGACCCF T.gT.gaCcC	CHICGHHGIIG IAATGAAGTGG .aa.GAagTgg	TGGATATGTT TGGALATGTT TGGALATGTT	CGTGACCGCT TGTGACGGCT CGTGaCgGCL	CAGCAGA CAGCAGA CAGCA.A
L.brasiliense T.brucei	1691 1700 +- TTCAACAGGCG TCCAGCAAGCA	1710 ACCGAGTTCCTT ACCGAGTTCGTT		1730 TGCGCGATCI TTCGTGATA	1740 ICAACGACGAA ICACTGGAGAGA	1750 TCGACGATGO NATACARAGO	1760 ACCTGCAAAC	1770 GRAGCTGCT GRAGCTTCT	1780 GGAGATAAACC AGAGATTAACC	1790 TCAAGTACTC TGAAGCATTC	1800 GCACCCGTCC CCATCCGTCG	1810 GTCGCCGACAI GTTGCGGAGAG	1820 1 IGATCTT IGATCTT
Ť.vivax Consensus	TTCAGCAGGCG TLCAgCAgGCg 1821 1830	ACCGAGTTTATT ACCGAGTTC.TT 1840	CTTGAGGTCT CTgGAgGTcc 1850	TGCGAGGGAA TgCG.Gata 1860	1GAATGACGAG1 1cAatGacGAgt 1870	TCGACAAAAG LogACaAagG 1880	ACCTCCAGAC ACCTCCAAAC 1890	CGAAACTTTT CGAAgCTtcT 1900	GGAAAATAAAATT gGAgATaAAAcc 1910	TAAAACATTC T.AAgcALTC 1920	CCATCCTTCT CCALCCgTC.	GTGGCGGAGA GT.GCgGAgAI 1940	AGATATT Agatett 1950
L.brasiliense T.brucei T.vivax	CGTCCGGAATA TGCTCGCGGTG TGCGCGTGGTG	TTTGCCAGTACT TGTGTGTTCACT TTTGCCTCTATT	ACGACGGCAT TTGATGCCAT ACGATGGCAT			AGCGGGGTCGC AACGCGCTTC AACGAGCTGC	TCTGCACCAC CCTTCCACAC ACTTCCTCAC	SCRCGCGATT SCGCGCCTATT SCGCGCCATT	GAGTGCTATAT GAGTGCTATG GAGTGCTACG	GATTGCTCAG TAATGGCCCAG TAACGGCCCAG	AAACAGGACCI AGGATGGACCI AATCAAGACCI	CCAACCTCAA CGGGCATTGA CCGACCTTGA	CAACCTC
Consensus	LGc.CG.ggTg	TtTGcct,tAcl 1970	1980	GaaGCT.GC. 1990	CC.CTCTGEG	AaCG.Gctgg 2010	2020	CgCGC.ATT 2030	GAGTGCTALg1 2040	1.ALgGC.CAG	Aa.cagGACC	2070	2080
L.brasiliense T.brucei T.vivax Consensus	TCGAGCATCCG GCTAACATTCG TCGAACATACG LCgAaCAT.CG	CCGCTGCCTAAA TCGTTGCTTTTC CCGTTGTCTCTC CCGLTGCCT.LC	HCAGTTGCAG TAATGCCCAA CCATGCTCGC CATGCTCGC	AGCTTTAACO GTGCTCAGCO AGCTTTAATO agctTtAaco	CTGAGTGGCTO CTGATTGGGT CCGGAGTGGATA CCGGAgTGG.T.	CGTCGAGTTC TATCGAGTTC ATTGGAATTC TCGAgTTC	TTCGGTAAGC TTCGGCAAAC TTTGGAAAAC TTCGG.AAaC	TCAACAAGC TGAGCCCAG TCAGTCAGG TCAGTCAGG	AGGAAAAGCCTC GAGACAGCATC CCGATAGCATC GA.AGCaT	CAAGTGCCTCG AAGTGCCTAG CGATGCCTGG CGATGCCTGG	AGGACCT-CT AGGACCTTCT GGGACCT-CT aGGACCT-CT	GCACCAACTCI TGCT-AACCA TGCAGAACCA LgcAACca	CACCAG ICACCAG ICATGAG CGTGAG
L.brasiliense	2081 2090	2100 ACTTGTGCAGG1	2110 GGCCACTAAG	2120 TACAGTGAC		2140 CACCGACCTO	2150 ATTGGCATG	2160	2170 ACAACCTGTA	2180 GACGTGCTCT	2190 ACTACTATCT	2200	2210
T.brucei T.vivax Consensus	AACTTCAAAAT AACTTTAAGGT AaCTTCAAggT	CATTGTGCAGGT GATTGTGCAGGT .aTTGTGCAGGT	TGCAACAAAG GGCGACGAAG gGC_AC_AAG	TACAATGAA TACAGTGAT TACAgTGA.	GCGCTCGGTGCG GCTCTTGGAGCC GCLCTcGG,gCg	GGACAAACTA GGACAAACTT ggaCaAaCT.	ATTAACGTGT ATCGAGCTCT ATtgac.Tg1	TTCTTCGAGC TTTCTTGAGC TTCCTLGAGC	GGAAACTGTTT AAAAATTGTAC a,AAacTGTac	GATATICIGT CCCATCCIGT gacat.Cigi	ATTATTACCT ACTATTATCT Actaltalct	TGGCGCTGTG TGGTGCCATT LGG.GCcgTg	GTACC <mark>G</mark> T GTACCAT GTACC ₈ T
L.brasiliense	2211 2220			2250	2260	2270	2280	2290				2330 ACGAAGAATTI	2340
T.vivax Consensus	ACACCCGCGAC ACAC CGLGAL		TTCCGCTACA	TTGAGGCCGG	CAGCAGAGGTGC CAGCAGAGGGTGC C.GCtGAggTgC	GTCAGGCAC GGtCAggtgC	AAGAACTGGF	IGCGCATGAC	ACGCGAAAGCC aCGcGAgAGCC	CCTGCTACGA	TCCGGAGCGC ccC.GAGCGc	ACGAAAAAACTI ACGAAgaAcTI	ACTTGAA ACctgaa
L.brasiliense T.brucei	2341 2350 	2360 TGACGGACCTG1 TGACARACCTT1	2370 GGCCCTTCAT	2380 CAACGTCTG CAACGTCTG	2390 FGATCAGCACA FGACCAGCACA	2400 CATGGTGAF	2410 CGAGATGGTO TGAACTGATT	2420 Cactacctt Cgttatctg	2430 GTGGAGACGAC ATTGACACAAA	2440 CAACGAGAAC CAATGAAGCT	2450 TACATCGAGCI CTTATTGAGCI	2460 Antacgtgaci Agtacgtgca	2470 1 SCGCCGC SCGCCGC
T.vivax Consensus	AAACAAAAAGT gAaCAAgAAg.	TGACCAATCTTT TGAC.aAcCTtT	GGCCACTCAT GGCCccTcAT	CAATGTATG Caacgtetg	rGATCAACATGO rGALCAgCAcaa	GCTACATAGE actt.gT.gF	ITGAGCTAGTO ILGAgcTggTg	CGGTATTTC Cg.TALCTg	ATTGATACGG aTLGA.ACgaa	CAACGAGACG CAAcGAgac.	CTTATTGAAC CLLATLGAgC	AATACTTG <mark>CA</mark> AaTACgTGcal	GCGTCGG GCGcCGc

	2471	2480	2490	2500	2510	2520	2530	2540	2550	2560	2570	2580	2590	2600
L.brasiliense	AGCCC	TGGTAAG	ACGCCACAGGT	AGTGCAGGCC		GCAACGTG	GCGAGGACT		TECTCTCAG	TGGTGGGGAC	ATGTGCCCCF	GTGAGGAGCT		GTGGAGG
T.vivax	AGTCC	GGGAAAG	ACACCTGAGGT	AGTGGCTGCC	CTCATCGAC	GCAATGCT	GAGAAGACT		TTCTCAATG		ATGTGCCCCF	TTGCGGAGTT	GGTGCAAGCC	GTGGAAG
conactiada	2601	2610	2620	2630	2640	2650	2660	2670	2680	2690	2700	2710	2720	2730
	1	COTOCOC.			TCCOCCOCCO		2000	2070						1
T.brucei T vivay	AGCGC	AGTCGGC			TEGAAGCCCC		AAAAAAAGACO		TCATAATGO				TTACCCGAGA	AGTTCAT
Consensus	Agcg.	.gTCGgC	T.CgcCTcATt	.aac.gTGGc	TgGAgGcCCC	itct.gcgGf	aAAgAAGACO	GAtaccGCcCT	LCACAATGC	••TgGcaAAg	TcTacGTcga	cA.tGgccA.	aCCcGAga	Aatte.t
	2731	2740	2750	2760	2770	2780	2790	2800	2810	2820	2830	2840	2850	2860
L.brasiliense T.brucei	GGCGG TGAGG	AGAACGA AGAACGA	GTACTACGATG	CGTTGGTGGT CAGTGGTCAT	GGGTAGGTAC	TGTGAGACC	CGCGACCCC	ACTTGGCCTAT	ATTGCCTAT TTGGTTTAT		ICTGCAGCAAC		ACCTCTGCTA AGATCACATC	TCGCAAC
T.vivax Consensus	ACTTG	AAAACGC AgAACGa	CTACTACGAAC TACTACGALC	CACTAGTCCT Ca.TgGTc.T	TGGAAAGTAC 2GGLAaGTAC	TGCGAGAA TGCGAGaa	CGTGATCCG	ATCTGTCCTAC	ATCGCCTAT aT.GccTAT	CGCAAGGGCCC CGCaAgG.tcl	ICCTCAGTGAC	GAGCTGGTGG GASCTGGT_G	AGCTCACCAC AgcTCacctc	GAAGAAT
	2861	2870	2880	2890	2900	2910	2920	2930	2940	2950	2960	2970	2980	2990
L.brasiliense	GGCAT	GTACAAG	CAACTGGCCCG	стасстаетс	AAGGAGCAGC	ATCTTGACO	TGTGGACGA	CGTGCTGCCAC	AGGACACGG	CTCACCGGCA	CAGCTTGTAG	AATCGGTGCA	GCAGACTGCC	CTGCCAG
T.brucei T.vivax	GGCAT GGCAT	GT <mark>GGAAG</mark> GTGGAAA	CAACTTGCTCG CAACTTGCTCG	CTACCTTGT CTATCTTGT	Inaacaacago Caggagaaga	ACCCTGCAC	CTTTGGGCGT CTGTGGGCAT	CTGTGCTCACGO CAACCCTGAAAA	AAAGCTCGA ATGATACCA	TCAACCGAGA AGGATCGTGA	CCCCCCCGTTC CCCCCTCGTTC CCCCCTCGTCG	A <mark>gg</mark> cggttca A <mark>rg</mark> cggtgca	ACAAACTGCA ACAAACCGCC	CTTCCCG CTGCCTG
Consensus	GGCAT	GTggAAg	CAACTEGCECG	CTACCTEGTa	aAggAgcAGg	AtCtTgaal	TgT66gCgto	:,gtgCTgacag	A.gacaCga	ACCG.gA	Cg.CTLGT.C	AagCGGTgCA	aCAaACtGCc	CTgCC.G
	2991 	3000	3010	3020	3030	3040	3050	3060	3070	3080	3090	3100	3110	3120
L.brasiliense T.brucei	AGAGT	GTGGTGA GAGGTAA	GCGAGGAGGTG CGGAGGAGGTG	AGCACGACGU	TGAAGGCGT	TATGGATGO	GGAGCTGAC	GAGGAGC TGAC	CGCGCTGCT CTCTATACT	AAGCCAGATTO AGATCAGATCO	TCGTCCGTGC	CCGCTTCCGC	AAGAACCGCT AAGAACCGCT	ATTTGGA
Consensus	AGLCT	GaGGTaa	GAGGAGGT <mark>8</mark>	ACCAC.AC.C	TEGGELHI	CATGAALGO	.HGGGHTGHC .gagcTGAC	<mark>ggAgGAac</mark> TGAC	ctCtaT.CT	agatCAgATt	iTgGTgCg.GC	CGCTTLaGg	AAgAAcCGcT	LLLTgGA
	3121	3130	3140	3150	3160	3170	3180	3190	3200	3210	3220	3230	3240	3250
L.brasiliense	GRACC	TTCTTAT		TECETTCCC	CAAAGATAAC	GTGATGGA	TACGTGACG			GCCGACATTG	ACACCTCGC	TCCGGCGCCG	GCATGCATGA	GGTGGCG
T.vivax	GAATC	TTTTGAT	CATGACCGCCA	TCCGTTCTCC	CAAGGAAAAA	GTGATGGA	TATGTGTCA	CATTGGAGAAT	TACGACGCC		CAGCATCGCC	AGCAACGCAG	AGTTGCCTGA	AGTGGCC
Consensus	3251	3260	3270	3280	3290	3300	3310	3320	3330	3340	3350	3360	3370	3380
			98787782828		10100				0.000000000000000000000000000000000000	0.000000000000000000000000000000000000	02000000000000000000000000000000000000	00000000000000000000000000000000000000	00100100	1
T.brucei T.vivas	ATGAC		GACAAGTTTGA GACAAGGAACGA	AATGAGGATG	GAGGCTGCCF			GAAGGACCTTC		GGTTGTACGC		ACCTACCTGC ATATACCCGC	TGTATGGACA TGTTTGGTCA	GTTTTGG
Consensus	tTtgc	CGTLTAC	ga.aag.acgA	cATGaagAaG	iGAGGC <mark>cgcc</mark> f	lcgGTgcT,t	TgCggGATL	rGAAgGAt.TTt	CgCGLGGLC	G.tccTacGC.	CAgAaGtg.g	AcatacCcGC	TGT.TGGLCa	GT.LTgG
	3381	3390	3400	3410	3420	3430	3440	3450	3460	3470	3480	3490	3500	3510
L.brasiliense T.brucei	GCGAG GAGAA	TACCTGG TACCTCC	T-GAAGC <mark>AGG</mark> A TCG <mark>CC</mark> GCCGG-	TGAGGTGCAC TGAGGTGCGT	GAGGGTATCO GAAGCCATTO	AGTGCCTCF AGGTCCTCF	ITCAAGGCCA IT <mark>TCG</mark> CGCGA	16 <mark>AATCCCG</mark> ACC 16AATCCCAACT	TCGTTGTCG ACGTTGATG	AAGTGACCTC	GCTGCGGAGC	GCACGAATCA GCAGTAACCA	ATACAGTGAT ATTCGGGGGAC	CTCATCA CTCGTCA
T.vivax Consensus	GGGAG G.GAg	TATTTGC TAccTgc	FTGCCGCAGA- F.GccGCaGg.	CGAGGTGCAT LGAGGTGCat	GAGGCGATTC GAgGc,ATtC	AATCATTTE Agt.ccTcf	TTCGAGCAAI	AGGATCCAGACT AGaATCCcgACt	TTTTGGAAG .tcgTtGa.G	AAGTTACGGCO aaGT.AC.gCO	GCGGCGGAG GC.GCGGAG	GGAACAATCA GcAAAtCA	GTTTGGTGAT aTtcgGtGAt	CTTATCA CTcaTCA
	3511	3520	3530	3540	3550	3560	3570	3580	3590	3600	3610	3620	3630	3640
L.brașiliense	AATAC	стстсбя	TGGCACGCCAG	TACTCACGCO	CRARGEACAC	CAAGATCG	CACGGCGCT	бтсяттяссти	TGCCANGAC	AGGCCGCCTC	GGGAGTTGGA	GGAGTTCCTC	AAGCAGGCGC	ACAACGT
T.vivax	AATAC	CTCACCA	TGGCACGCAAA	GAATCCCGTC	CAAAGGACA	CARAATTG	TACGGCGTT	GTECTTACATE	Teccaneac	CGGTCGTCTG	TTGGAGTTGGF	AGAGTTCCTA	AUNCHCHCCC	ACAATGT
Lonsensus	HaTHC 20.41	2CE0	DCC0	gH, ILCCGLE	эсоо	CHHgH I Cur	1.atbbcgt 1	2818C1CHU81F	2720		gung uur	3750	aHa, Hgalgl	2770
l branilianna		Treecer			5660 C60C00CT	3630	SCECECETE		5720	Terecreer		5750 C00CTC0TCC	3760 TCOCCOOCCT	1
T.brucei	ACAGA	TTCAACC	TGTGGCTGACA	AGTGCTTTGF	AGATGGGTAC	TATGATTC	GCGCGTCTG	TCTACTCCATC	AGCATGAAC	TTCCATAAAT	GGCCCTTACC	CTTGTGCGCA	TGAACAACCT	TGCTGAG
Consensus	.cAgA	TtcaacC	LgTgGCLGAcA	AGTGCTTCGA	CGA.gggtts	TALGA.TC	GCGCG. gTG	TgTAcaCc.TC	gc.a.cAAc	Ttc.ccaaac	reGCe.t.ACe	ct.gTGagga	TGAacAAcCT	.cC.gag
	3771	3780	3790	3800	3810	3820	3830	3840	3850	3860	3870	3880	3890	3900
L.brasiliense T.brucei	GCCGT GCTGT		GCCAAGAAGGC GCGCAGAAGGC					SCATTGAGGCTG	GAGACATGA			TCCCGGTGGT TTCCCCTCGT	GCTCAAGGCA TCTACAGGTG	GAGGAGG GAATCTC
Ť.vivax Consensus		GGAGGCT eGAeGCt	GC <mark>GC</mark> AAAAGGC GC <mark>ec</mark> AeAAGGC	ACAGTCAAGA ccAGTC.ago	AAGACATGGE	CAGCTGTTF	ATATTGCCT ALCLLGCCT	GTATTGAGGC <mark>CF</mark> GLATTGAGGCCC	ATGAGATTA	AACTGGCCAA	ATATGTGCCC	TTCCACTTGT TLCC.cT.GT	ACTAGAAGCC .CTa.AgGc.	GAAATGT GAae.
	3901	3910	3920	3930	3940	3950	3960	3970	3980	3990	4000	4010	4020	4030
L.brasiliense	TCAGC	<mark>66</mark> САТСТ	ACRACCOCTAC	GAAAGCCGCG	GCATGTGGGF	GGAACTTT	стсестест	AAGATTGCCTC	TAGTCATCA	GGGCGCGCACI	тотстатста	САСССАААТС	GGCGTTTTGC	TGGCCAA
T.brucei T.vivax	TGCAA	GATGTCG AGTGTCA	TGAACCGGTAC TGGATCGCTAT	GAGGCATACO GAAAGTTATO	GTCTTTATG	ITGAACTGT IAGAATTGC	CICCCTOCT	CAAGAGTGCCTC	CTCCACACC	TGGCGCGCACACACACACACACACACACACACACACACAC	ITG <mark>GGCATT</mark> TT ITG <mark>GGTGTTTT</mark>	CACTGAAATG TACTGGAATG	GGACTACAGC	TTGCCAA TGGCGAA
Consensus	Tgcaa	ggtglc.	LgaHcCGcTHc	GHaag.tact	iG.cTtTggGi	I.GHHCTgt	CEC.gTgCT	HHGH.LGCcTU	.actaa.cc	GGCGCgCHcl	HiggtaltI	CHCEGaAHTG	GuacTtetuc	Tecchh
	4031	4040	4050	4060	4070	4080	4090	4100	4110	4120	4130		4150	4160
T,brucei	GTATA	AACCCGA				AAGAAGAT	AACGCACAC		GTTTGCGAG	GAATACCACC	CTGGTTGGCC	CTECETETEC	TCCACGTCGG	CAACGAG
Consensus	gTALA	ggCCcGA	gAAaCTctTaG	AgCAcGTGaA	CATGLACLC	AAGAAGAT	AAtaCaCAc	AgaTGATc.Ct	Gt.TGcGAG	igAgTAcCAtCa	acTGGtTgGtg	CTgCGtgTtc	T.CRcgTCaa	CAACGAG
	4161	4170	4180	4190	4200	4210	4220	4230	4240	4250	4260	4270	4280	4290
L.brasiliense T.brucei			GCGGCCAACTT GCGGCGAAGAC	GATGATGCAT		ACACCTTC	ACAACGAGA	ICTTCAAGGAAC	TTATTAGCC		AGCGATGTCC	TGTACACGGC TATATAACGC		
T.vivax Consensus	GATTG GACTG	GCTTGCT GCTgGCL	GCCGCCACGAC GCgGCcAagac	GATGATGCGC GATGATGCSC	CACCACGTCO CaccacGc.O	ATGCCTGG	ATCATGACG	TTTCAAGACTC	TT <mark>GTG</mark> AGTC	ATTTGGGATC	AGCGATTTGC AGCGATLT.C	TGTACAACTC TgTAcAacgC	CATCCCATTC	TACATCC TAC.TCa
	4291	4300	4310	4320	4330	4340	4350	4360	4370	4380	4390	4400	4410	4420
L.brasiliense	I GG <mark>AC</mark> A	САССТС	ACCACCTGARC	GACTTCCTGT	сстссатст	CAAGCGCG1	GGACCCGGA	CGAGTGATGGA	GGAGACGAT	GAGGGTGACA	CCGATCTACGT	GATTCGAGCC	TTTCTCGAGA	CCGCGCA
T.brucei T.vivax	ATACG AAAAC	TGCCCTC AATCCAC	RARACCTGTGC RACTCCTTGAC	GACTTTCTGA	CCAGCATGT1 CCAGTATGT1	CAAGGTGC TAAGACGT	TGACCCCGA GGACCCCCGA	CGTGTGTCTCCG	TGAGGTGAA GGAGGTGAA	GAAGCTCGCC	CTGTGCACTT	GATTCTGCCA TATTCGTCAG	TACCTCGAAT TATCTGGAGT	CCGCACA CTGCCCA
Consensus	a.Hc.	.actitic	Hacall'Ig.al	GHUTTEUTga	CcagcHIgII	CHHGg.	geneteen	Cutulg.lgc.	gunugeun	gHagg1.gUcl	Ugal.CHU.I	gHIICg.cc.	Tattictingt	CCGC.CH
	4421	4430	4440	4450	4460	4470	4480	4490	4500	4510	4520	4530	4540	4550
T.brasiliense T.brucei	ACCGC	6CAACTC		ACGATGCTCT	GAACGATCTO	TACGTGGAG	GAAGAAAAT	TTGTGGCCTTF	CGTAACTCT	GTAGAGAACT	CAACAACTTC	GACTCTGTGG	AGTTGAGCGC	ACGGCTG
Consensus	ggagC	6CAACte	CaggggTgA	AtGAgGCtc1	AACgA.CT.	TAcaTgGAC	GAaGAagAc	Tca.ggC.tTg	CGL.ACTCL	GT_GAGa_cTa	ataACAACTTC	GACTC+G+gG	Agt Tgag + gC	acgGCT.
	4551	4560	4570	4580	4590	4600	4610	4620	4630	4640	4650	4660	4670	4680
L.brasiliense T.brucei	GARAA GACAA	GATGGAA		TCGTAAGATT	GCCATECTEC	TECATCOC	AGAACAAGC	CTACGCCCACC	CCATTGCAG	CCGCAAAGGA	GAACAAGCTCT	TCGACGAGGC		
T.vivax Consensus	GAAAA GAAAA		TTTTTGAGTT		GCGCTTTTTC	TCCATCGC	GTAACAAGC	ATTTACACATO	CCATTGCCG	TGGCGAAGGA	GAACAAACTCT GAACAAACTCT	ACCAGGATGC		
	4681	4690	4700	4710	4720	4730	4740	4750	4760	4770	4780	4790	4800	4810
L.brasiliense	AGAGT	бстбасб	CCGAGCTCGTG	ACCAGCCTGC	тсбастаст	CGTGAAGGA	статсссба	тестттетесс	ототстстя	СЛЕСТАСТАС	ACCTECTER	GCCCTCGGCG	GTGTTGTTGR	АСССТС
T.brucei T.vivax	AAAGC AGAGT	GCCGATC GCCAACC	CAAAGGTTGTG CGCAGATTGTA	GAGGAACTTC GAGGATCTTC	TTGACTTCTI	TGCAGTTGF	ACGACCAGA TCACCCGGA	TCATTCGTTTC STGCTTTGTTGC	CTGCCTTTA GTGTCTTTA	IC <mark>GCC</mark> TGCTATI IC <mark>AC</mark> ATGCTA <mark>C</mark> I	GACTACTTGTC GACTACCTCAC	TCCGGACGTG ACCACAGGTC	GTTCTTGAGA GTGATGGAAA	AGGCTTG
Consensus	AgAGL	6CcgAcc	CAG.TLGTg	gagga.CTtC	T.GACTLCT	[<mark>tGt,gtg</mark> Gf	1.ca.CC.GA	TgeTTLGTLgC	gtglctlta	ICac.TGCTAc	GACtaccTgac	.CCagGtg	GTg, TggagA	AGGC.TG
	4811 	4820	4830	4840	4850	4860	4870	4880	4890	4900	4910	4920	4930	4940 I
L.brasiliense T.brucei	GCTGA	ATCATCG A <mark>CA</mark> ACCG	RACTGAGGTAG	CAATGCCGTA C <mark>C</mark> atgcCgta	ICATGATTCAU ICCTCATTCAU	IG TGCTTCA IGC <mark>CA</mark> TCCA	GAATACTCG	IGCAAGATCGAT CAGCG <mark>GGTATC</mark> A	AGGATGGAG ICGCTTGGAA	AAGTCGATGG AAGGGCGCTAI	ICGACGCGCAC ICGACGGCATC	GTTG <mark>CGGCGA</mark> CAGCCATCAA	AAGATGCGGC AAGATGGATC	TCGTCGT
T.vivax Consensus	GCTCA GCT_A	ACAAGCG AcaA.CG	TACGGACCTCG LAc.gAT.G	C <mark>C</mark> ATGCCGTF C <mark>C</mark> ATGCCGTF	ICTTTATTCAC	iGTCATTCAF iGtcaTtCAa	GANTHCHCH GANTACAC.	CARAGITATCO	CGCATGGAG CGCATGGAg	AAGTCCATGA AAGtccatgal	rGGACGCCCAF .gGACGcccag	cacggCaA	AGGAGGCGGC AaGALGcggC	GAGGCG- tcGtCGt
	4941	4950	4960	4970	4980	4990	5000	5010	5020	5030	5040	5050	5060	5070
L.brasiliense	6CC66	CCCA	ATGCAGGG	TCCCAGCGCC	ECECCACTC	TGAT-CCA	CAGGGTG	CGGCATGGTG	TGAACGGGA		TGAGTAGG	CCCAGCCG	-CCGATGAGC	TTTGGCG
T.vivax	66066		CTGCATACGGG			TGATTCAAC	CAGGGCCAG			TGCCAATGCCI	ATGCCAATGC	CAATGCCGAT	GCCAATGATG	
CONSENSUS	agculi 5071	5020	5090	5100	5110	5190	5129		s+s+cgcGH	nducall	aHcgl	dc.gllu	+ersarga*c	sgrubtli
brasilierse		+			5110 +	512V	I							
T.brucei	TGCCC		GATATGCTGGA	GGGATGGG	AAACCCTAA	ATGATGCCC	TACTGA							
Consensus	LGCC.	.g.cagg	a.t.c.g.	Gccgca	gttcg aa	agGagGCC.	TaCTag							

Anexo 5. Análisis de la secuencia de la CLH de *Homo sapiens, Bos taurus* y *T. vivax. Homo sapiens y Bos taurus* presentan una identidad de 53,2% y de 39,0% respectivamente con *T. vivax.*



	2081	2090	2100	2110	2120	2130	2140	2150	2160	2170	2180	2190	2200	2210
T,vivax Bostaurus Homosapiens Consensus	CATCO GTTCA GTTCA gtTCa	TGACTTGGGT 16GA1 1AGA1 1.GA1	GACACCCCAG GAAGAACCTC GAAGAAGCCTC GAaga,CCtc	TAGTGGACCO TTGCTGATAT TTGCTGACAT TTGCTGACAT	CARATGAAGT CACCCAGAT CACACAGAT CACACAGAT CACACAGAT	GTGGATATGT IGTCGATGTGT IGTAGATGTCT GTAGATGTCT GT.GATgTgT	TTGTGACGGO TTATGGAATO TTATGGAATO TTATGGAALO	CTCAGCAGA CAATCTAA CAATCTAA CAATCTAA	TTCAGCAGGCGA TTCAGCAGTGTA TTCAGCAGTGTA TTCAGCAG <mark>TG</mark> TA	CGGAGTTTA CTGCATTCT CTGCATTCT CLGcaTTCL	TTCTTGAGGT TGCTTGATGC TGCTTGATGC TgCTTGALGC	CTTGCGAGG CCTGAA TCTGAA ccTGaa	SAAGAATGAC GAATAATCGCI SAATAATCGCI GAALAATCgCi	CATCTA CATCTA CATCTA CATCTA CATCTA
	2211	2220	2230	2240	2250	2260	2270	2280	2290	2300	2310	2320	2330	2340
T.vivax Bostaurus Homosapiens Consensus	CAAAA AAGGT AAGGT aAggt	IGACCTCCAGA CCTTTACAGA CCTTTACAGA CCTTTACAGA	ICGAAACTTTT ICGAGGTTGCT ICGCGGTTACT ICGaggtT.cT	GGAAATAAA TGAGATGAAO TGAGATGAAO LGAgATgAAO	TTAAAACAT CTTATGCAT CTTATGCAT CTTATGCAT	TCCCATCCTTC SCACCTCAG	TGTCGCCGA -GTCGCAGA -GTTGCAGA .GT.GCaGA	GAAGATATT IGCTATTCT IGCTATTCT IgctATtcT	TGCGCGTGGTGT AGGCAATCAGAT AGGCAATCAGAT AGGCAATCAGAT	TTGCCTCTA GTTCACGCA GTTCACACA gTtCac.cA	TTACGATGGC TTATGACCGC TTATGACCGC TTALGACCGE	ATGAAGCTTI GCTCATATCI GCTCATATTI gctcAtaTti	SCTCCTCTGT SCTCAGCTGT SCTCAACTGT SCTCAACTGT	GTGAACG GTGAAAA GTGAAAA GTGAAaa
	2341	2350	2360	2370	2380	2390	2400	2410	2420	2430	2440	2450	2460	2470
T.vivax Bostaurus Honosapiens Consensus	AGCTO GGCTO GGCTO BGCTO	iGACTTCCTCF iGCCTCTTGCF iGCCTACTGCF iGCCT.ctgCf	IGCGCGCCATT IGCGTGCGTTA IGCGTGCATTA IGCGLGC.LTa	GAGTGCTACO GAA GAA GAa	TCACGGCGC -CACTTCAC -CATTTCAC .CACLLCaC	IGAATCAAGAC IGACTTATA IGATTTATA GATTTATA	CCCGACCTTC TC 	ACAACCTC ATA ATA ATA ATa	TCGAACATACGC TAAAGCGTGC TAAAACGTGC TaaAaCgTGC	CGTTGT-CT AGTCGTTCA AGTCGTTCA aGT.GTLCa	CTCCCATGCT CACGCATCTT CACCCCATCTT CACCCCATCTT CaCcCATctT	CGCAGCTTT CTT CTT CTT	ATCCCGAGT ACCCTGAGT ACCCTGAGT ACCCTGAGT ACCCLGAGT	GGATATT GGTTAGT GGTTAGT GGLTAGT GGLTAgT
	2471	2480	2490	2500	2510	2520	2530	2540	2550	2560	2570	2580	2590	2600
T₊vivax Bostaurus Homosapiens Consensus	GGAATT GAATT CAACT gaA.T	ACTITGGAA ACTITGGGTC ACTITGGTC ACTITGG.LC	ACTCAGTCAG CTTATCAGTG CTTATCAGTA CTTATCAGTA	GCCGATAGC GAAGACTCCC GAAGACTCCC GaaGACTCCC	TGCCATGCC TAGAATGCC TAGAATGCC TAGAATGTC TagaATGcC	FGGGGGACCT FCAGGGCCATG FCAGAGCCATG FCaGgGcCaTg	CTTGCAG CTGTCTGCCI CTGTCTGCCI CTgtCtGcci	ACCATCGT ATATTCGT ACATCCGT ACATCCGT	GAGAACTTTAAG CAGAATCTACAG CAGAATCTGCAG CAGAATCTGCAG	GTGATTGTG ATCTGTGTA ATTTGTGTT aT.tgTGT.	CAGGTGGCGF CAGGTGGCT CAGGTGGCT CAGGTGGCLL	CCAAGTACA CTAAGTATC CTAAATATC CTAAATATC CLAAgTALC	GTGATGCTCT TGAACAACT TGAACAACT TGAACAACT TGAacaaCT	TGGAGCG STCCACT STCAACT StCAACT stcaaCt
	2601	2610	2620	2630	2640	2650	2660	2670	2680	2690	2700	2710	2720	2730
T.vivax Bostaurus Homosapiens Consensus	GACAA CAGTO CAGTO CAGTO CAGTO	ACTTATCGAC TCTGATTGA TCTGATTGA LCTgATLGA	CTCTTTCTTG CTTTTTGAAT CTTTTTGAAT CTLTTTgaat	AGCAAAAATT CTTTCAAGAQ CTTTCAAGAQ ctttcAAgaq	IGTACCCCAT GTTTTGAAGG GTTTTGAAGG gtTttgaagg	CTGTACTATT ICTTTTTATT ICTCTTTTATT ICT.TLLTATT	ATCTTGGTG TTCTGGGAT TTCTGGGAT LTCTgGGaL	CATTGTAC CATTGTTA CATTGTTA CATTGT <mark>T</mark> A	CATACACCCGCG ACTTTAGTCAAG ACTTTAGCCAGG ACTTLAGCCAGG	ACCCCGAGG ACCCAGATG ACCCAGATG ACCCAGATG	TGCACTTCCC TGCACTTTAF TGCACTTTAF TGCACTTCaa	ICTACATTGA INTATATTCA INTATATTCA INTATATTCA INTALATTCA	GCCGGCAGCA GCCAGCTTGCI GCCAGCTTGCI GCCAGCTLgC	GAGGTGG TAGACTG TAGACTG AGACTG AGactG
	2731	2740	2750	2760	2770	2780	2790	2800	2810	2820	2830	2840	2850	2860
T.vivax Bostaurus Honosapiens Consensus	GTCAG GGCAG GGCAG GgCAg	GCACAAGAAC ATCAAAGAAC ATCAAAGAAC ATCAAAGAAC atcaAAGAA	TGGAGCGCAT TAGAAAGAAT TAGAAAGAAT TAGAAAGAAT	GACACGCGAA CTGCAGAGAAA CTGTAGAGAAA ctg.aGaGAA	AGCCCCTGC AGCAACTGC AGCAACTGC AGCAACTGC	FACGATCCCGA Fatgatcctga Facgatcctga Facgatcctga	GCGCACGAA GCGAGTCAA GCGAGTCAA GCGAGTCAA GCGagtcAA	AACTACTT AATTTTCT AATTTTCT AATTTTCT AALTLLCT	GAAAAAACAAAAA CAAGGAAGCGAA TAAGGAAGCAAA AAggAagcaAA	GTTGACCAA GCTAACAGA ACTAACAGA gcTaACagA	TCTTTGGCCF TCAGTTACCF TCAGCTACCF TCagttaCCF	ICTCATCANT ICTTATCATTI ICTTATCATTI ICTLATCALTI	GTATGTGATC GTGTGCGACC GTGTGTGTGATC GTgTGLGALC	ACATGG ATTTGA ATTTGA ATTTGA ALLTGa
	2861	2870	2880	2890	2900	2910	2920	2930	2940	2950	2960	2970	2980	2990
T₊vivax Bostaurus Homosapiens Consensus		TAGATGAGCI TCCATGATTI TCCATGATTI TCCATGALLI	AGTGCCGTAT GGTGCTCTAT GGTGCTCTAT gGTGCtcTAT	TTG-ATTGA TTATATAGAA TTATATAGAA TTATATAGAA TTatATAGAA	ACGGACAAC ATAATCTTC ATAATCTTC ALAALCLLC	GAGACGCTTAT AGAAGTATAT AAAAAGTATAT AgAaGtaTAT	TGAACAATA AGAAATATA AGAGATATA aGAaatATA	CTTGCAGCG IGTACAGAA IGTACAGAA gTaCAGaa	TCGGAGTCCGGG GGTGAATCCAAG GGTGAATCCAAG ggtGAaTCCaaG	AAAGACACC TCGACTGCC TCGACTTCC tcgact.CC	TGAGGT-AGT TGTGGTTATT TGTAGTTATT TGLgGTLALT	GGCTGCCCT GGGGGGATTA GGAGGATTA GG.gGatta	CATCGACTGC CTTGATGTTG CTTGATGTTG CtTgatgTtg CtTgatgTtg	ATGCTC ATTGCTC ACTGTTC A.TGCTC
	2991	3000	3010	3020	3030	3040	3050	3060	3070	3080	3090	3100	3110	3120
T,vivax Bostaurus Homosapiens Consensus	GAGAR - TGAR - TGAR - TGAR	IGACTITATCA IGATGTCATTA IGATGTCATAA IGALgTCAT.F	IAGAATATTCT IAAAACTTGAT IAAAACTTGAT IAAAACtTgaT	CAATGCTGTA TCTTGTTGTTGTA TCTTGTTGTTGTA LCLTGLTGTGTA	IGGAACGATG IAGAGGTCAA IAGAGGTCAA IAGAggtcaa	IGCCCCATTGC ITCTCTACTGA ITCTCTACTGA ILCLCLACTGA	GGAGTTGGT(TGAGCTTGT TGAGCTTGT LGAGCTLGT	CAAGCCGT IGCTGAGGT IGCTGAGGT IGCTGAGGT	GGAAGAACGATC TGAAAAAAAGAAA TGAAAAAAAGAAA LGAAaAAAAGAaa	TCGCCTGCG CAGATTGAA CAGATTGAA caGatTGaa	TCTGATTCAP ACTGCTTCTC ACTGCTTCTC ACTGCTTCTC ACTGCTTCLC	ICGGTGGCTG ICCTTGGCTG ICCTTGGCTA ICCTTGGCTA ICCLTGGCTg	SAGGCCCGTT SAGGCCAGAA SAGGCCAGAA SAGGCCAGAA	TCATGA TCATGA TTCATGA TCATGA
	3121	3130	3140	3150	3160	3170	3180	3190	3200	3210	3220	3230	3240	3250
T.vivax Bostaurus Homosapiens Consensus	AAAGA GGGCT GGGCT gggct	AGACGGATCO GTGAAGAGCO GTGAGGAGCO of gagGAgCO	CGCCCTTCAC TGCTACTCAT TGCTACTCAC	AATGCCGTG AATGCATTAC AATGCCTTAC	GAAAAGTTGT	CGTCGATACC CATAGACAGT CATAGACAGT CATAGACAGT	GACCAACAAC AATAACAATO AATAACAACO	CTGATAAA CAGAGCGG CGGAGAGAGA	TTTTTACTTGAA TTTCTTCGGGAA TTTCTTCGTGAA	AACCCCTAC AATCCTTAC AATCCCTAC	TACGAACCAC TATGACAGTO TATGACAGTO	TAGTCCTTG GTGTTGTTG GCGTTGTTG	SAAAGTACTG SAAAGTATTG SAAAGTATTG	CGAGAAC IGAGAAG IGAGAAG
oonoonodo		segueungee		minucceru	icciniaa i c ii	icaraunciigu	ancancan.	.c.angaga	IIICICLECUM	HHCCLCIHL	Inconcaget	.g.0108110	annna i ne i a	GAGAAg
oonoonouo	3251	3260	3270	3280	3290	3300	3310	3320	3330	3340	3350	3360 3360	3370	GAGAA8 3380
T.vivax Bostaurus Homosapiens Consensus	3251 I CGTGA AGAGA AGAGA aGaGA	3260 TCCGAATCTO TCCGCATCTO TCCACATCTO TCCGCATCTO	3270 TCCTACATCG GCCTGTGTGTG GCCTGTGTGTG GCCTGtgtgTtG	3280 CCTATCGCAG CTTACGAGCC CTTATGAACC CLTALga.cg	3290 GGGCCACCT TGGCCAGTG TGGCCAGTG CGGCCA_tg	3300 CAGTGAGGAGG IGATCTGGAGC IGATCTGGAAC cgaTctGGAgC	3310 TGGTGGAGCC TTATCAATG TTATTAATG TLaT.aALg	3320 GACCACGA CACCACGA CTGCAATG TTGCAATG CtgCAatg	3330 3330 Agaatgcatgt Agaattccctct Agaattccctct Agaattccctct	3340 GGAAACAAC TCAAAAGTC TCAAAAGTC LCAAAAGTC	3350 TTGCTCGCTF TGTCTCGCTF TTTCTCGCTF TLLCTCGCTF	3360 TCTTGTACA TCTGGTACG ICCTGGTACG ICCTgGTACG	3370 3370 GGAGAAGAATI GCGGAAGGACI ICGAAAGGATI gcggAAGgALI	CAGAGAAg 3380 1 CTTCAAC CAGAAT CCAGAAT CCAGAAT
T.vivax Bostaurus Homosapiens Consensus	3251 CGTGA AGAGA AGAGA aGaGA 3381	3260 TCCGAATCTC TCCGCATCTC TCCGCATCTC TCCGCATCTC TCCGCATCTC 3390	3270 TCCTACATCG GCCTGTGTGTG GCCTGTGTGTG GCCTgtgtgTtG 3400	3280 CCTATCGCAA CTTACGAGCC CTTATGAACC CLTAtga.cg 3410	3290 1666CCACCT 166CCAGT6 166CCAGT6 166CCAAT6 266CCA.tg 3420	3300 CAGTGAGGAGG IGATCTGGAGG CGATCTGGAAC LgaTctGGAgC 3430	3310 TGGTGGAGGC TTATCAATG TTATTAATG TLaT.aALg 3440	3320 CACCACGA CTGCAATG CTGCAATG CTGCAATG CtgCAatg 3450	3330 Agaatggcatgt Agaattccctct Agaattccctct Agaattccctct 3460	3340 GGAAACAAC TCAAAAGTC TCAAAAGTC LCAAAAGTC LCAAAAGTC 3470	3350 TTGCTCGCTF TGTCTCGCTF TTTCTCGCTF TLLCTCGCTF 3480	3360 TCTTGTACA TCTGGTACG TCTGGTACG CCTGGTACG LCTgGTACg 3490	3370 GGAGAAGAAT CGGAAGGACI TCGAAAGGACI CCGAAGGACI gcggAAGgACI 3500	CAGAAAg 3380 CTTCAAC CCAGAAT CCAGAAT CCAGAAT CCAGAAT 3510
T.vivax Bostaurus Honosapiens Consensus T.vivax Bostaurus Honosapiens Consensus	3251 I CGTGA AGAGA AGAGA AGAGA AGAGA 3381 I TGTGG TGTGG TGTGG	3260 TCCGAATCTC TCCGCATCTC TCCGCATCTC TCCGCATCTC 3390 GCATCTAACCC GGCAGCGTGC GGCAGCGTGC GGCAGCGTGC GGCAGCGTGC	3270 TCCTACATCG GCCTGTGTTG GCCTGTGTTG GCCTgtgTLG 3400 TGCAAAAATGA TGCTGGAAAG TGCTGGAAAG TGCTGGAAAG TGCTGGAAAG	3280 CCTATCGCAG CTTATCGAGCC CTTATGAGCC CTTATGAGCG CTTATGAGCG 3410 TACCAAAGGAT CRATCCTTAC CRATCCTTAC CRATCCTTAC	3290 BGGGCCACCTI TTGGCCAGTG TTGGCCAGTG TTGGCCAGTG 3420 CGTGATCGA AGGAGACCCC CAGGAGACCCC CAGGAGACCCC CAGGAGACCCC	3300 CAGTGAGGAGG GATCTGGAGG GATCTGGAGG GaTCtGGAGG 3430 TTGTGGAGGG CTCATTGATCA CTANTTGATCA TTATTGATCA TTATTGATCA	3310 TGGTGGAGGC TTATCAATG TTATCAATG TTATTAATG TTAT.AAtg 3440 GGTGCAACAA GGTTGTACAA GGTTGTACAA GGTTGTACAA GGTTGTACAA GGTTGTACAA		3330 	3340 GGRAACAAC TCAAAAGTC TCAAAAGTC tcAAAAGTC tcAAAAGTC tcAAAAGTC 3470 GGTAGATGA GGACCCCGA GGACCCCGA GGACCCCGA		3360 TCTTGTACA TCTGGTACG TCTGGTACG CCTGGTACG LCTgGTACg 3490 ACAACAGTT GTAACTGTC GTAACTGTC GTAACTGTC	3370 GGAGAAGAAT CGGAAAGGAAC CGGAAAGGAC CGGGAAGGAC 3500 CGGGCATTCA AAGGCCTTTCA AAGGCCTTCA	CAAGAAg 3380 1 CTTCAAC CCAGAAT CCAGAAT CCAGAAT CCAGAAT CCAGAAT CCAGAAT CCAGAAT 3510 3510 3510 1 FGAATGC FGACTGC FGACTGC
T.vivax Bostaurus Homosapiens Consensus T.vivax Bostaurus Honosapiens Consensus	3251 I AGAGA AGAGA AGAGA aGaGA 3381 I TGTGG TGTGG TGTGG 3511	3260 3260 ITCC6AATCT0 ITCC6CATCT0 ITCC8CATCT0 3390 GCATCAACC0 GGCACCACCA GGCACCACCG GGCACCACCACCCG GGCACCACCACCCCG GGCACCACCACCCCCCG GGCACCACCACCACCCCCCCCCC	3270 TCCTACATCG GCCTGTGTTG GCCTGTGTTG GCCTGtgtgtgtg 3400 TGAAAAATGA TGCTGGAAAG TGCTGGAAAG TGCTGGAAAG TGCTGGAAAG 3530	3280 CCTATCGCAC CTTATCGAACC CTTATCAACC CLTAtGAACA CLTAtga.cg 3410 TACCAAAGGA CAATCCTTAC CAATCCTTAC CAATCCTTAC CAATCCTTAC CAATCCTTAC CAATCCTTAC CAATCCTTAC	3290 IGGGCCACCT ITGGCCAATG ITGGCCAATG ItGGCCAATG ItGGCCAATG ItGGCCAATG ItGGCCAATG ItGGCCAATG ItGGCAATGAATGAA ItGGAAGACCC ItGGAAGACCCC ItGGAAGACCCC ItGGAAGACCCC ItGGAAGACCCC ItGGAAGACCCC ItGGAAGACCCC ItGGAAGACCCC ItGGAAGACCCC ItGGAAGACCCC ItGGAAGACCCC ItGGAAGACCCC ItGGAAGACCCC ItGGAAGACCCCC ItGGAAGACCCCC ItGGAAGACCCCC ItGGAAGACCCCCC ItGGAAGACCCCA ItGGAAGACCCCCA ItGGACCACCAATG ItGGCAATG ItGGCAATG ItGGCAATG ItGGCAATG ItGGCAATG ItGGCAATG ItGGCAATG ItGGCAATG ItGGCAATG ItGGCAATG ItGGCAATG ItGGCAATG ItGGCAATG ItGGCAATG ItGGCAATG ItGGCAATG ItGGCAATG ItGGAAGACCCC ItGGAAGACCCC ItGGAAGACCCC ItGGAAGACCCC ItGGAAGACCCCAATG ItGGAAGACCCAATG ItGGAAGACCCAATG ItGGAAGACCCAATG ItGGAAGACCCAATG ItGGAAGACCAATG ItGGA	3300 CAGTGAGGAGG CGATCTGGAGC CGATCTGGAAC cgaTctGGAAC 3430 CTTGTGGAAGC CTTGTGGAAGC CTTGTGGAAGC CTTGTGGAAGC CTTGTGGAAGC CTTGTGGAAGC CTTGTGGAAGC CTTGTGGAAGC CTTGTGGAAGC CTTGTGGAAGC	TGTGGGGGGGGG TTATTAATG TTATTAATG TLaT.aAtg 3440 GGTGCAACAI GGTGGCAACAI GGTTGTACAI GGTLgLACAI 3570	3320 3320 ICACCACGA ICTGCAATG ICTGCAATG ICTgCAATG ICTgCAATG ICTGCAATG ICTGCAATG ICTGCAATG 3450 AACCGCCCTT AACAGCCCTT AACAGCCCTT 3580	3330 BEANTGECATET BEANTLECTET BEANTLECTET BEANTLECTET 3460 SECTEGAGATETE SECTEGAGACTEG SECTEGAGACTEG SECTEGAGACTEG 3590	AHCCLCTHL 3340 GGAAACAAC TCAAAAAGTC LCAAAAAGTC LCAAAAAGTC GGACCCCGA GGACCCCGA GGACCCCGA GGACCCCGA GGACCCCGA GGACCCCGA GGACCCCGA GGACCCCGA GGACCCCGA	3350 TTGCTCGCTF TGCTCGCTF TGCTCGCTF TGCTCGCTF TGCTCGCTF 3480 GGAGGTAAGG GGAGGTAAGG GGAGGTAAGG GGAGGTAGG GGAGGTACC gGAGGTgLca 3610	3360 TCTTGTACA TCTGGTACG CCTGGTACG LCTgGTACG 3490 ACARCAGTTI GTARCTGTCI GTARCTGTCI GTARCTGTCI GTARCCGT. 3620	3370 3370 3666666667 3500 3500 3500 3500 3666677768 3666777768 3630	.GAGAAAg 3380
T. vivax Bostaurus Honosapiens Consensus T. vivax Bostaurus Honosapiens Consensus T. vivax Bostaurus Honosapiens Consensus	3251 I CGTGA AGAGA AGAGA AGAGA aGaGA 3381 I TGTGG TGTGG 3511 I AGGGA AGACC AGACC AGACC	3260 3260 TICCGAATCTG TICCGCATCTG TICCGCATCTG 3390 GCATCAACCT GGTAGCGGG GGCAGCGGGG GGCAGCGGGG GGCAGCGGGG GGCAGCGGGG GGCAGCGGGG GGCAGCGGGG GGCAGCGGGG 3520 TIGGCACATGG TTCCTAATGG TTCCTAATGG TTCCTAATGG TTCCTAATGG	3270 TCCTACATCG GCCTGTGTTG GCCTGTGTTG GCCTGLTGTTG GCCTGLTGLTG 3400 TGAAAAATGA TGCTGGAAAG TGCTGGAAAG 3530 INTTGACGTCT INCTCATTGAA INCTCATTGAA INCTCATTGAA INCTCATTGAA	3280 CCTATCGCAGC CTTATCGAGC CTTATCGAGC CTTATGAACC CTTATGAACC CTTATGAACC CTTATGAACC CTTATGAACC CATCCTAGAGA CAALCCTTAC CAALCCTTAC CAALCCTCGAGAG CTGCTGGAGG CTGCTGGAGG	3290 GGGCCACCT TGGCCAGTG TGGCCAGTG TGGCCAGTG 3420 CGTGATCGA AGGAGACCCC AGGAGACCCC 3550 ANATTGTCC ANATTGTCC ANATTGTCC	3300 36 TEAGAGAGC 16 TEAGAGC 17 TEAGAGC 17 TEAGAGC 14 TEAGAGC 14 TEAGAGC 14 TEAGAGC 15 TEAGAGC 16 TEAGAGC	ancancan. 3310 TGGTGGAGC TTATTARATG TTATTARATG TTATTARATG TTATTARATG 3440 GGTGCAACAA GGTGCAACAA GGTGCAACAA GGTGCAACAA 3570 CTTTAGGI GTATTCAGTI gtaTTCAGGI GTATTCAGTI gtaTTCAGGI	3320 (CACCARCAN (CACCARCAN (CTGCARTA (CTGCARTA (CCCCCCTT (CCCCCCTT (CCCCCCTT (CCCCCCCTT) (CCCCCCCTT) (CCCCCCCTT) (CCCCCCCTT) (CCCCCCCTT) (CCCCCCCTT) (CCCCCCCTT) (CCCCCCCTT) (CCCCCCCTT) (CCCCCCCTT) (CCCCCCCTT) (CCCCCCCTT) (CCCCCCCTT) (CCCCCCCTT) (CCCCCCCTT) (CCCCCCCTT) (CCCCCCCTT) (CCCCCCCTT) (CCCCCCTT) (CCCCCCTT) (CCCCCCTT) (CCCCCCTT) (CCCCCCTT) (CCCCCCTT) (CCCCCCTT) (CCCCTT) (CCCCCTT) (CCCTT) (CCCCTT) (CCCCTT) (CCCCTT) (CCCCTT) (CCCCTT) (CCCCTT) (CCCCTT) (CCCCTT) (CCCTT) (CCCCTT) (CCCCTT) (CCCCTT) (CCCCTT) (CCCCTT) (CCCCTT) (CCCCTT) (CCCCTT) (CCCCTT) (CCC	3330 AGANIGLOLICI AGANIGLOLICI AGANITEECETEI 3460 SECTEGAGIETEG SECTEGAGIETEG SECTEGAGIETEG 3550 TTTTEGGGANAG AGECTEGAARG AGECTEGAARG BAECTEGAARG BAECTEGAARG BAECTEGAARG	HITCECETIC 3340 GGAAACCAAC TCAAAAGTC TCAAAAGTC TCAAAAGTC TCAAAAGTC 3470 GGTGCAATGA GGACCCCCGA GGACCCCCCGA GGACCCCCGA GGACCCCCCCGA GGACCCCCGA GGACCCCCGA GGACCCCCCGA GGACCCCCGA GGACCCCCCGA GGACCCCCCCCCGA GGACCCCCGA GGACCCCCGA GGACCCCCGA GGACCCCCGA GGACCCCCGA GGACCCCCGA GGACCCCCGA GGACCCCCGA GGACCCCCGA GGACCCCCGA GGACCCCCGA GGACCCCCGA GGACCCCCGA GGACCCCCGA GCACCCCCGA GCACCCCCCCCCC	3350 TTGCTCGCTF TGCTCGCTF TGCTCGCTF TGCTCGCTF TGCTCGCTF TGCTCGCTF 3480 GGRGGTGTCG GGRGGTGTCG GGRGGTGTCG GGRGGTGTCG GGRGGTGTCG GGRGGTGTCG GGRGGTGTCGCGCCF TCGCTGCCH TCGCCGCGCGCG TCGCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG	3360 TTCTTGTACG TTCTGGTACG CCTGGTACG LCTgGTACG LCTgGTACG 3490 ACAACAGTT GTAACTGTC GTAACTGTC GTAACTGTC 3620 TTCCGTTCTCC TTCAAGGCTG TTCAAGGCTG TCCAGTCGTC	3370 GARAMANA CCGANGGACI CCGANGGACI CCGANGGACI 3500 CGGCCATTCA AGGCCTTCA AGGCCTTCA AGGCCTTCA AGGCCTTCA 3630 CCANGCAACA CCGTACACC ACCGTACACC	
T.vivax Bostaurus Honosapiens Consensus T.vivax Bostaurus Honosapiens Consensus T.vivax Bostaurus Honosapiens Consensus	3251 I GGTGA AGAGA AGAGA AGAGA 3381 I TGTGG TGTGG 3511 I AGGGA AGACC AGACC AGACC 3641 I	3260 3260 1TCC6ARTCT TCC6ARTCT TCC6ARTCT TCC6ARTCT 3390 56CTCARTCT 3390 56CTCARTCT 55C 56CTC6CTG 56CTCCTG 55C 55C 35C0 35C0 35C0	3270 3270 1TCC1ACRTCG GGCT61GTTG GGCT61GTTG GGCT61GTTG GGCT61GTTG GGCT61GTTG GGCT61GTTG TGCT66AAAG 1GCTC61GAAG 3530 INTTGCGCTCTTGAA INGTCATTGAG INGTCATCAG INGTCAG INGTCAG INGTCATCAG INGTCATCAG INGTCAG	3280 CCTATCGRAC CTATCGRAC CTATCGRAC CTATCGRAC CTATCGRAC 3410 TACCARGAN CARTCCTAR CARTCCTAR CARTCCTAR 3540 ATCCTGGGAG CTGCTGGGAG CTGCTGGGAG CTGCTGGGAG CTGCTGGGAG CTGCTGGGAG CTGCTGGGAG CTGCTGGGAG CTGCTGGGAG	3290 HGGCCACCT TTGGCCACG TTGGCCACT TTGGCCACTG TTGGCCACTG TTGGCCACTG 3420 CCTGGTCCACTG AGGCGACCCC AGGCGACCCC AGGCGACCCC 3550 CACTGTCCCC AGGCGACCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	3300 AGTGNGCACC TGATCTCGARAC GATCTCGARAC GATCTCGARAC GATCTCGARAC 3430 TTGTGGARAC TCATTGARAC TCATTGARAC TCATTGARAC TCATGAR	ancancan 3310 TGGTGGAGC TTATCARAG TTATCARAG Add GGTGCARCA G	3320 (CACCARCAN (CACCARCAN (CTCARATA (CTCARATA (CCCCCCT) 3450 (CCCCCCT) 3450 (CCCCCCCT) 3580 (ACCACCCCT) 3580 (ACCACACACA 3580 (ACCACACACACACACACACACACACACACACACACACA	3330 AGAN TECCETO AGAN TECCETO AGAN TECCETO AGAN TECCETO 3460 SECTOBACTOR SECTOBACTOR SECTOBACTOR SECTOBACTOR SECTOBACTOR AGAN SECTOBACTOR AGAN SECTOBACTOR SEC	Antelectine 3340 Generation	3350 TTGCTCGCTF TGCTCGCTF TTCCCGCTF TTCCGCGTF TTLCTCGGCTF TLLCTCGGTF GGRGGTGTGCG GGRGGTGTGCG GGRGGTGTGCG GGRGGTGTGCG GGRGGTGTGCG TCGCTGCGC TCGCTGCGA TCGCCGCG TCGCTGCGA TCGCCGCG TCGCTGCA TCGCCGCG TCGCTGCA TCGCCGCG TCGCTGCA TCGCCGCG TCGCTGCA TCGCCGCG TCGCTGCA TCGCCGCGCG TCGCCGCG TCGCGCGCG	3360 11CTTGTACA 11CTGTACA 11CTGGTACG 11CTGGTACG 11CTGGTACG 3430 14CACA 14CA	3370 3000000000000000000000000000000000	2000
T.vivax Bastaurus Honosapiens Consensus T.vivax Bostaurus Honosapiens Consensus T.vivax Bostaurus Honosapiens	3251 I CGTGA AGAGA AGAGA AGAGA 3381 I TGTGG TGTGG 3511 I AGGGA AGACC AGAC	3260 TICCGARTCT TICCGARTCT TICCGARTCT TICCGARTCT TICCGARTCT 3390 3520 3520 TIGGCCARTCG 3520 TIGGCCARTGT TICCTARTG 3650 TICCTARTGT 3650 TICCTARTGT 3650 TICCTARTGT 3650 TICGTCARCC TICTGTCACC TICTGTCACC	3270 TCCTACATEC GCCTGTTTG GCCTGTTGTG GCCTGTGTG GCCTGTGTG GCCTGTGTG GCCTGTGTG TCGTGGAAAATG TCGTGGAAAATG TCGTGGAAAATG TCGTGGAAAATG TCGTGGAAAATG TCGGGAAAATT CCTGGGAAAATT CCTGGGAAAATT CCTGGGAAAATT	3280 CCTATCEGAG CTTATCEGAG CTTATCEGAG CTTATCEGAG CLTATLEga.cg 3410 TACCARGEAT CARTECTTA AGAINET CARTECTTA AGAINET CARTECTTA AGAINET CARTECT AGAINET CARTECT AGAINET CARTECT AGAINET CARTECT AGAINET CARTECT AGAINET CARTECT AGAINET CARTECT AGAINET CARTECT AGAINET CARTECT AGAINET CARTECT AGAINET CARTECT AGAINET CARTECT AGAINET CARTECT AGAINET CARTECT AGAINET CARTECT AGAINET CARTECT AGAINET CARTECT CA	2290 16660CACCT 17660CARGT6 17660CARGT6 17660CARGT6 3420 1660GARGC4 3420 1660GARGC4 3550 1860GARGC4 3550 1860GARGC4 3550 1860GARGC6 186	atronomical and a second	3310 TGGTGGAGG TTRITGARG TTRITGARG TTRITGARG TTRITARA GGTGGCARCAR GGTGTGARCAR GGTTGTCARCAR GGTTGTCARCAR GGTTGTCARCAR GGTTGTCARCAR GGTTGTCARCAR GGTTGTCARCAR GGTTGTCARCAR GGTARGCARG GCARGCGCARG LCRGCARG LCRGCARG	3320 3320 CRCCACAN CRCCACAN CRCCACAN G CCCCAN CACAN 3450 3450 3450 3450 3450 3450 3450 3580 360 3580 3710 3580 3710 3510 3710 3710 3710 3710 3710 3710	3330 agan togonal mean togonal mean togonal agan togon	3340 3340 GGRANCHER GGRANCHER TEGRANGIC TEGRANGIC TEGRANGIC 3470 3470 GGTAGGATGAN GGTAGGATGAN GGGACCEGAN 3600 CTTTIGATC CTECTTAL TECHNIC 3730 CGATTACK CCATTTICC CCATTTICC CCATTTICC CCATTTICC		3360 3360 10CTIGENEGIA 3430 10CTIGENEGIA 3430 3A60 3430 3A60 3430 3A60 3620 10CTGETEGE 3620 10CTGETEGE 3520 10CCGTTCCC 3520 10CGGTTCCC 3520 10CGGTTCCC 3520 10CGGTTCCC 3750 10CGTGGGADARCE 3750 10GTGGADARCE 10GTGGADARCE	3370 SBRANCAN THE LOCAL SCREAMENGENT SCREAMENCENT SCRE	CAGGAA 3380
I. viivaa Bastairus Honnospiise Consensus T. viivaa Bostaurus Honosapiens Consensus Honosapiens Consensus Honosapiens Consensus I. viivaa Bostaurus Honosapiens Consensus	3251 CGTGR AGAGG AGAGG AGAGG 3381 TGTGG TGTGG TGTGG 3511 GAGAG AGAGC AGAGC GAGTE GAGTE GAGTE GAGTE GAGTE GAGTE GAGTE GAGTE GAGTE	3260 TICCGARTCIC TICCGCATCI TICCGCATCIC TICCGCATCIC TICCGCATCIC GGTATCIG GGTATCIG GGGACTGAC GGCACTGAC TICCICANG GGCCACCIG TICCICANG TICC	3270 TCCTACATEG SECTOTO SECTOT	3280 CCTATCEGAG CTTATCEGAG CTTATCEGAG CTTATCEGAG CLTATLEga.cg 3410 TACCARGEA CARTECTTA AGAINET CARTECTTA AGAINET CTTATCA 3540 ALCCTEGAG	3290 6660CCACCT 17660CCARGT6 17660CCARGT6 17660CCARGT6 3420 17660CARGT6 17660CARGC4 3420 17660CARGC4 3420 17660CARGC4 3550 17660CARGC4 176700 1767000 176700 176700 176700 176700 1767000 1760	3300 RETEREGRECO GRITCIGAREG GRITCIGAREG GRITCIGAREG GRITCIGAREG GRITCIGAREG JA330 JTGATGRITCIGATE TIGATGRITCI TIG	antancanta 3310 TRATEARIG TTRATEARIG TTRATEARIG TLAT_ARLg 3440 GGTGCARCAR GGTTGTAC	3320 TCRCCRCGR TCTGCRATG TCTGCRATG TCTGCRATG TCGCRATG TGCTGCRATG 3350 ARCAGCCT 3580 ARCAGCCT 3580 ARCAGCCT 3580 ARCAGCCT ARCAGCCT 3580 ARCAGCCT 3580 ARCAGCCT 360 ARCAGCCT 3710 ARCAGCCT 3710 3740 37	3330 agan teccnet agan teccnet agan agan teccnet agan agan teccnet agan agan teccnet agan agan agan teccnet agan	A Construction of the cons		3360 3360 10161617066 10171617067 10176617066 101767707 10176617067 3430 3430 3430 3660 101767067 3670 3620 1010661761 3620 101061717174060163 101704066163 101063753 3620 101064763 3620 101064763 3620 101064763 3620 101064763 3620 101064763 3620 101064763 3620 101064763 3620 101064763 3620 101064764 3620 3350 3620 3620 3620 3880 3880	3370 GBGGRGGAT CGGRAGGAT CGGRAGGAT CGGRAGGAT CGGRAGGAT CGGRAGGAT CGGRAGGAT CGGRAGGAT CGGRAGGAT CGCCCCCT CCGCCGCCCCT CCGCCGCGAT CCGCCCCCT CCGCCGCGAT CCGCCGCCCCT CCGCCGCGAT CCGCCGCCCCCCCCCC	CAGANAg 3380
T. vivax Bostarus Honostarus T. vivax Bostarus Honosapiens Consensus T. vivax Honosapiens Consensus T. vivax Bostarus Honosapiens Consensus	3251 1 CGTGA GAGAG AGAGA AGAGA 3381 1 TGTGG 3511 1 AGGAG AGGAG AGGAC	3260 1700	3270 TCCTACATCG	3280 CCTRICGAGC CTIRICGAGC CTIRICGAGC CTIRICGAGC CTIRICGAGC CTIRICGAGC ALL CRAICCTIRIC CRAICCTIRIC CRAICCTIRIC CRAICCTIRIC AICCIGAGC AIC	2290 GGGCCACCT TGGCCAGG TGGCCAGG TGGCCAGG 3420 CGTGATCGA AGGAGAGCCC AGGAGAGCCC AGGAGAGCCC AGGAGAGCCC AGGAGAGCCC AGGAGAGCCC AGGAGAGCCC AGGAGAGCCC AGGAGGCCCC AGGAGGCCCC AGGAGGCCCC AGGAGCCCC AGGAGCCCCC AGGAGCCCCC AGGAGCCCCCCCCCC	and remaining and remaining an	ancancant 3310 TEGTEGRAC TTATCARA TTATCARA 3340 GGTEGRACA GGTEGRACA GGTEGRACA GGTEGRACA GGTEGRACA GGTEGRACA GGTEGRACA GGTEGRACA GGTEGRACA GGTEGRACA GGTEGRACA STOO COMPOSITION COMPOSITIO COMPOSITION COMPOSITION	3320 GRCRCGANTG CTCCARTG	3330 GRANTGECHTG GRANTGECHTG GRANTGECHTG GRANTGECHTG GRANTGECHTG GRANTGECHTG GRANTGECHTG GRANTGECHTG GRANTGECHTG GRANTGECHTG GRANTGEGEN GR	A State of the second s	3350 3350 116CTCCCF 11CTCCCF 11TCTCCCF 11TCTCCCF 2480 5000 5000 5000 5000 5000 5000 5000 5	3360 11CTGTACG 11CTGTACG 11CTGTACG 11CTGTACG 11CTGTACG 11CTGTACG 11CTGTACG 11CGTGTCG 11CGTGTCG 11CGTGTCG 11CGTGTCG 11CGTGTCG 11CGTGTCG 11CGTGTCG 11CGTGTCG 11CGTGTCG 11CGTGTCG 11CGTGTCG 11CGTGTCG 11CGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG	3370 360,000,000 360,000,000 360,000,000 360,000 360,000 360,000 360,000 360,000 360,000 3760 3760 3760 3760 3760 3760 3760 3	GRGAR 3380 3380 CGGAR CGAR CGGAR
T, vivex Bostaurus Hoostaurus Consensus T, vivex Bostaurus Honosepiens Consensus T, vivex Bostaurus Honosepiens Consensus T, vivex Bostaurus Honosepiens Consensus	2251 12-5- CGTG6A AGAGG AGAGG 3381 1 1GTGG 3381 1 1GTGG 3381 1 1GTGG 35511 1 36641 1 3641 1 3771 1	3260 TCC6441C10	3270 TTCT FIGHTER SECTO	3280 CCTRICGGA CTRICGA CTRICGA CITALGA CALC CITALGA CALCALGA CALCALGA SALO CALCALGA CITALGA CALCALGA CITALGA CALCALGA CITALGA CALCALGA SALO CITALGA CALCALGA SALO CITALGA CALCALGA SALO CITALGA SALO SALO SALO SALO SALO SALO SALO SAL	3290 GGGCCACCT TGGCCAGTG TGGCCAGTG TGGCCAGTG TGGCCAGTG TGGCCAGTG TGGCCAGTG TGGCCAGTG TGGCCAGTG TGGCCAGTG TGGCCAGTG TGGCCAGTG TGGCCAGTG TGGCCAGTTG TGGCCAGTTG TGGCCAGTTG TGGCCAGTG TGCCAGTG TGGCCAGTG TGCCAGT	3300 2300	ancancant ancancant asing as	3320 GRCRCGGRTG GRCCRCGRTG CTGCGRTG GrtgCRATG GrtgCRATG GrtgCRATG GrtgCRATG GrtgCRCCTT ACGGCCTT ACGGCCTT AGCGCCCCT AGCGCCCT AGCGCCCT AGCGCCCT AGCGCCCT AGCGCCCT AGCGCCCT AGCGCCCT AGCGCCT AGCGCCT AGCGCCT AGCGCCT AGCGCCT AGCGCCCT AGCG	3330 3330 SAGAN TGCCHTG HARNITGCCHT HARN	A Construction of the cons	3350 3350 1161CC6C1 11CC6C1 11CC6C1 3480 3680 3680 3680 3680 3680 3680 3680 36	3360 11CTTGTACA 11CTGGTACG 11CTGGTACG 11CTGGTACG 11CTGGTACG 11CTGGTACG 11CTGGTACG 11CTGGTACG 11CGGTAC	3370 SGRANGART TO SGRANGART SGRANGAGEC	GRGAR 3380 CLGGART
T, vivax Bostarus Honosajiens Consensus T, vivax Bostarus Honosajiens Consensus Honosajiens Consensus Honosajiens Consensus Honosajiens Consensus T, vivax Bostarus Honosajiens Consensus	3251 I GGAGG GGAGG 3381 I IGTGG IGTGG IGTGG 3511 I IGTGG IGTGG 3511 I IGTGG IGTGG 3511 I IGTGG IGTGG 3511 I IGTGG IGTGG 3511 I IGTGGG IGTGGG IGTGGG IGTGGG IGTGGGG IGTGGGG IGTGGGG IGTGGGG IGTGGGGG IGTGGGG IGTGGGGGG IGTGGGGGGGG IGTGGGGGG IGTGGGGGGGGGG	2260 3260 TCCGGATCTC TCCGGATCTC TCCGGATCTC TCCGGATCTC TCCGGATCTC TCCGGATCTC 3390 TCGGCATCGCTG GGCGGCGCGGCG GGCGGCGCGGG GGCGGCGTGG 3650 TTCCCTATCGGATG 3650 TTCCCTATCGGATG 3650 TCGGGCGATTGG GGGGCATGG CGGGCAGGG CGGGCATGG CGGGCAGGG CGGG CGGGCAGG CGGG CGGG CGGC CGGG CGGC CGGC CGGC CGGGGG CGG CGG CGGG CGGG CGG CGGG CGG CGGG CGG CGG CGGG CGG CGGG CG	3270 TCCTACATCG TCCTACATCCTACATCG TCCTA	3280 CCTRICGCAR CTIRICGCAR CTIRICGNEC CLIRICGNEC CLIRICGNEC CLIRICGNEC CLIRICGNEC CHIRICGNEC CHIRICGNE 3540 ATCCIGGCAR ATCCIGGCAR 3540 ATCCIGGCAR 3540 ATCCIGGCAR 3540 ATCCIGGCAR 3540 ATCCIGGCAR 3670 ACCRIGGCAR 3670 ACCRIGGCAR 3670 ACCRIGGCAR 3670 ACCRIGGCAR 3670 ACCRIGGCAR 3670 ATCCIGGCAR 3800 ACCRIGGCAR 3330 ATTIGGGCAR 3330 ATTIGGGCAR 3330	2290 GGGCCACCT TGGCCAGTG TGGCCAGTG TGGCCAGTG TGGCCAGTG TGGCCAGTG TGGCCAGTG TGGCAGTG TGGCAGTG TGGCAGTTGCT 3650	and remaining and remaining an	ancanceant ancanceant fran		3330 GRANTGECHTG GRANTGECHT GRANTGECHT GRANTGECHT GRANTGECHT GRANTGECHT GRANTGECHT GRANTGECHT GRANTGECHTGER GRANTGEC	3340 3340 GGARACARC Connected State TCARARGE TCARARGE TCARARGE Connected State 3470 3470 3470 GGARCCCCGR GGARCCCCGR GGARCCCCGR GGARCCCCGR GGARCCCCGR GGARCCCCGR GGARCCCCGR GGARCCCCGR GGARCCCCGR GGARCCCCGR GGARCCCCGR GGARCCCCGR GGARCCCGR CTCCTARCCCCCGR CCCCCCTARCC CCTCCTARCC CCCTCCTARC 3840 GGARCCCGR GGARCCCGR 3890 CCTCARCCCT TGARGE 3990 CCTCARCCCT CCTARCCCT TGARGE	3350 3350 116010001 3480 3480 3480 3480 3480 3680 3680 1000 1000 1000 1000 1000 1000 1000 1	3360 3360 11CTGTACR 11CTGTACR 11CTGTACR 11CTGTACR 12GTAC 3490 3490 3490 3490 3490 3490 3490 3490	3370 3070	
T, vivax Bostaurus Concensus T, vivax Concensus T, vivax Bostaurus Honosapiens Consensus T, vivax Bostaurus Honosapiens Consensus T, vivax Bostaurus Honosapiens Consensus T, vivax Bostaurus Honosapiens Consensus	3251 I GGGGG GGGGG 3381 I IGTGG GGGG GGGG 3511 I GGGG GGGG GGGG GGGG GGGG GGGG GGGG GGGG GGGGG GGGGG GGGGGG	3260 TCCGGATCT TCCGGATCT TCCGGATCT TCCGGATCT TCCGGATCT TCCGGATCT TCCGGATCT TCCGGATCT TCCGGATCT TCCGATCT TCCGATCT TCCGATCT TCCCGATG TCCCGATCT TCCCG	3270 TCCTACATCG CTACATCG CTACATCG CTACATCG TCCTACATCG T	3280 CCTRICGGAG CTRICGGAG CTRICGAG CTRI	ACTION CONTRACTOR OF A CONTRACT OF A CONTRAC	3300 RETEREGENCE CENT CLEARE CENT CLEARE CENT CLEARE 3430 TTG TEGRAGE TTG TE	ancancan. 3310 TEG TEGROC TERTCARIA TEG TEGROC TERTCARIA GET CENCARIA GET CENCA	3320 CRCCACGAN CRCCACGAN CTGCAN CTGCAN CTGCAN CTGCAN CTGCAN CCGCCCCT CTGCAN CCGCCCCT CTGCAN CCGCCCCT CTGCAN CCGCCCCT CTGCAN CCGCCCCT CTGCAN CCGCCCCT CTGCAN CCGCCCCT CTGCAN CCGCCCCT CTGCAN CCGCCCCT CTGCAN CCGCCCCT CTGCAN CCGCCCCT CTGCAN CCGCCCCT CTGCAN CCGCCCCT CTGCAN CCGCCCCT CTGCAN CCGCCCCT CTGCAN CCGCCCCT CTGCAN CCGCCCCT CCGCAN CCGCCCCCCC CCGCCCCC CCGCCCCCCC CCGCAN CCGCCCCCCCCCCCCCCCC CCGCCCCCCCCCCCCC	3330 3330 SARA	algobia a	3350 11621C6C1 11721C6C1 11721C6C1 11721C6C1 3480 3480 3480 3680 3680 16800 1680 1680 168	3360 3360 10000 1000 1000 1000 1000 1000 1000 1000 1000 1000 1000	3370 500,000,000,000,000,000,000,000,000,000	GRAGAR 3380 3380 3380 3070 3070
T, vivax Bostarus Honosajiens Consensus T, vivax Bostarus Honosajiens Consensus Honosajiens Consensus Honosajiens Consensus Honosajiens Consensus T, vivax Bostarus Honosajiens Consensus	3251 I CGTGR AGAGG AGAGG 3381 I TGTGG 33611 I TGTGG 3511 I AGAGC AGAC AGACC AGAC AGACC AGAC AGAC AGAC AGAC AGAC AGAC AGAC AGAC AGAC AGAC AGAC AGAC AGAC AGAC AGAC AGAC AGAC AGACC AGAC AGAC AGAC AGACC AGAC AGACC AGAC AGACC AGAC AGAC AGAC AGAC AGAC AGACC AGAC AGAC AGAC AGAC AGAC AGAC AGAC AG	2260 3260 TCC6641C10 TCC6641C10 TCC6641C10 TCC6641C10 TCC6641C10 TCC6641C10 TCC6641C10 S390 TC6641C10 S390 TC6641C10 TC6741C10 S590 TC6641C10 TC6741C40 S590 TC664C1110 TC6741C40 S590 TC664C1110 TC674C641C10 S310 TC664C1110 TC674C641C10 S310 TC664C110 TC674C641C10 TC6744C641C10 TC674C641C10 TC674C641C10	3270 TCCTACATCG	3280 CCTRICGCA CTITICGCA CTITICGCA CTITICGCA CTITICGCA CLITICGCA CLITICGCA CLITICGCA CLITICGCA CLITICGCA 3540 TICCTGCGA CTICCTGA CALCCLLA 3540 ATCCTGCGA CTICCTGA CALCCLA CTICCTGA 3570 ATCCTGCGA CTICCTGA CALCCLA CTICCTGA CALCCLA CTICCTGA CALCCLA CTICCTGA CONTACT CCGCA CTICCGA CTICCTGA CONTACT CCGCA CTICCGA CTICCGA CTICCGCA CTICCGA CTICCGCA CTICCGA CTICCGA CTICCGCA CTICCGA	2290 GGGCCACCT TGGCCAGC TGGCCAGC TGGCCAGC TGGCCAGC TGGCCAGC TGGCCAGC TGGCAGCCAGC TGGCAGCAGC TGGCAGCAGC TGGCAGCAGC TGGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA TGGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA	3300 3300 3300 3300 3300 3610 3611	ancanceant ancanceant association associat		3330 3330 SAGAN COLORATION COLORADO SAGAN COLORADO SAGAN COLORADO SAGAN COLORADO SAGAN COLORADO SAGAN SAGA	algobia a	3350 3350 TTGCTCGCT TTGTCGCT TTGTCGCT TTGTCGCT 3480 3480 3680 3680 3680 TTGTCGCT 3680 TTGTCGCT 3680 TTGTCGCT 3680 TTGTCGCT 3680 3810 TTGTCGCT 3810 TTGTCGCT 3810 TTGTCGCT 3810 TTGTCGCT 3810 TTGTCGCCT 3810 TTGTCGCCT 3810 TTGTCGCCT 3810 TTGTCGCCT 3810 TTGCCGCT 3810 TTGCCGCT 3810 TTGCCGCT 3810 TTGCCGCT 3810 TTGCGCCCCT TTGCGCT 3810 TTGCCGCT 3810 TTGCCGCCT TTGCGCCT TTGCGCCT TTGCTGCCC TTGCTGCCCCT TTGTTGCT TTGCTGCCC TTGGTGCCCCCT TTGGTGCCCCCT TTGGTGCCCCCT TTGGTGCCCCCT TTGGTGCCCCCCT TTGGTGCCCCCT TTGGTGCCCCCT TTGGTGCCCCCCT TTGGTGCCCCCCT TTGGTGCCCCCCT TTGGTGCCCCCCT TTGGTGCCCCCCCT TTGGTGCCCCCCT TTGGTGCCCCCCT TTGGTGCCCCCCT TTGGTGCCCCCCT TTGGTGCCCCCCCC	3360 1000	3370 5060000000 5060000000000000000000000	
T, vivax Botsarus Hoosapias Consensus T, vivax Bostarus Hoosapias Consensus T, vivax Bostarus Honosapians Consensus T, vivax Bostarus Honosapians Consensus T, vivax Bostarus Honosapians Consensus	3251 1 16166 3381 1 16166 16166 3381 1 16166 16166 3511 1 16166 3511 1 16166 3641 1 66667 6771 1 16176 3771 1 16176 3771 1 16176 3771 1 16176 3771 1 16176 3771 1 16176 3771 1 1 161767 3771 1 1 161767 3771 1 1 161767 3771 1 1 161767 3771 1	3260 TCCGGATCTO TCCGGATCTO TCCGGATCTO TCCGGATCTO TCCGGATCTO TCCGGATCTO TCCGGATCTO TCCGGATCTO TCCGGATCTO TCCGGATCTO TCCCCTO TCCCTO TCCCTO TCCCCTO TCCCTO TCCCTO TCCCCTO TCC	3270 TCCTACATCG CCTACATCG	3280 CCTRICGGAG CTRICGGAG CTRICGAG CTRICGAG CTRICGAG CTRICGAG CTRICGAG CRICCIA CRICIA CRICCIA CRICCIA CRICCIA CRICCIA CRICCIA	2290 GGGCCACCT TGGCCAGTG TGGCCAGTG TGGCCAGTG TGGCCAGTG TGGCCAGTG TGGCCAGTG TGGCCAGTG TGGCCAGTG TGGCCAGTG TGGCCAGTG TGGCCAGTG TGGCCAGTTGCC TGGCTTGCC TGGCTTGCC TGGCTTGCC TGGCTTGCC TGGCTTGCC TGGCTTGCC TGGCTTGCC TGGCTTGCC TGGGTTGCCC TGGGTTGCCC TGGGTTGCCC TGGGTTGCCC TGGGTTGCCC TGGGCCCCG TGGGCCCCG TGGCCCCCG TGGCCCCCG TGCCCCCCCG TGCCCCCCCG TGCCCCCCCCCC	3300 3300 3300 3300 3300 3300 361 361 361 361 361 362 3630 360 370	ancancant ancant an	3320 CRCCACGAN CTGCATAGA CTGCATA CTGCATA CTGCATA CTGCATA CTGCATA CTGCATA CTGCATA CGCCCCT CGCCACA CGCCCCT CGCCACA CGCCCCT CGCCACA CGCCCCT CGCCACA CGCCCCT CGCCACA CGCCCCT CGCCACA CGCCCCT CGCCACA CGCCCA CGCCACACA CGCCACA CGCCACA CGCCACA CGCCACACA CGCCACACA CGCCACACA CGCCACACA CGCCACACA CGCCACACACA CGCCACACA CGCCACACA CGCCACACACACACACACACACACACACACACACACACA	3330 3330 SAGAN TGCCATG GARATTCCC TC GARATTCCC TC GARATTCCCC GARATTCCC GARATTCCC GARATTCCC GARATTCCC GARATTCCC GARA	A CELEGORIAL CONTRACTOR CONTRACTO	3350 3350 1161702611 3350 3350 1161702611 117070611 3480 3480 3680 3680 3680 3680 3680 3680 3680 36	3360 3360 1000	3370 3370 3370 3370 3370 3370 3370 3370 3370 3370 3060 3060 3070	GGGGAG 3380 3380 3380 3380 3380 3380 3380 338
Longonius Bostaurus Consensus T, vivex Bostaurus Consensus T, vivex Bostaurus Honosapiens Consensus T, vivex Bostaurus Honosapiens Consensus T, vivex Bostaurus Honosapiens Consensus T, vivex Bostaurus Honosapiens Consensus T, vivex Bostaurus Honosapiens Consensus	32511 1	3260 TCCGGATCT TCCGATCT TCCGATCT TCCGATCT TCCGATCT TCCGATCT TCCGATCT TCCGATCT TCCGATCT TCCGATCT TCCGATCT TCCGATCT TCCCATCATC TCCCATCATCATCA TCCCATCATCA TCCCATCATCA TCCCATCATCA TCCCATCATCA TCCCATCATCATCA TCCCATCATCA TCCCATCATCATCA TCCCATCATCATCATCA TCCCATCATCATCATCA TCCCATCATCATCATCATCATCATCA TCCCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATC	3270 TCCTACATCG CTACA	3280 CCTRICGGAG CTTRICGGAG CTTRICGGAG CTTRICGGAG CTTRICGGAG CTTRICGGAG CTTRICGGAG CTTRICGGAG CTTRICGGAG CTTCICGGAG CTGCIGGAG 35540 TTCCGGGCTRI 35540 TTCCGGGCTRI 35540 TTCCGGGCTRI 36570 TCCGGCCTRI 3670 TCCGGCCTRI 3670 TCCGGCCTRI 3670 TCCGGCCTRI 3930 TTCCGCCTRI 3930 TTCCGGCCTRI 3930 TTCCGGCCTRI 3930 TTCCGGCCTRI 3930 TTCCGGCCTRI 3930 TTCCGGCCTRI 3930 TTCCGGCCTRI 3930 TTCCGGCCTRI 3930 TTCCGGCCTRI 3930 TTCCGGCCTRI 3930 TTCCGGCCTRI 3930 TTCCGGCCTRI 3930 TTCCGCCTCRI 3930 TTCCGCCTCRI 3930 TTCCCCRI 3930 TTCCCCRI 3930 TTCCCCRI 3930 TTCCCCRI 3930 TTCCCCRI 3930 TTCCCCRI 3930 TTCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	2290 GGGCCACCT TGGCCAGTG TGGCCGCTG TGGCCCCTG TGGCCCTG TGGCCCCTG TGGCCCTG TGGCCCTG TGGCCCTG TGGCCCTG TGGCCCTG TGGCCCTG TGGCCCCTG TGGCCCCTG TGGCCCCTG TGGCCCCTG TGGCCCCTG TGGCCCCTG TGGCCCCTG TGGCCCTG TGGCCCTG TGGCCCTG TGGCCCCTG TGGCCCCTG TGGCCCCTG TGGCCCCTG TGGCCCCTG TGGCCCCTG TGGCCCCTG TGGCCCCTG TGGCCCCTG TGGCCCCTG TGGCCCCTG TGGCCCCTG TGGCCCCCCC TGGCCCCTG TGGCCCCTG TGGCCCCTG TGGCCCCCCC TGCCCCCCCCCC	3300 3300 3300 3300 3300 360 361 361 361 361 361 362 363 363 3430 3660 360 360 <	ancancan. ancancan. ancancan. ancancan. ancancan. ancancan. ancancan. ancancan. ancancan. ancancan. ancancan. ancancan. ancancan. ancancan. ancancan. ancancan. ancancan. ancancancan. ancancancan. ancancancancancancancancancancancancanca	3320 CRACCACGAN CRACCACGAN CTGCANTG CTGCANTG CTGCANTG CTGCANTG CTGCANTG CTGCANTG 3450 3450 3450 3450 3450 3450 3450 3580 3710 3840 1657	3330 3330 SARA	and Control of the second seco	3350 11621C621 11621C621 1171C1C6C1 1171C1C6C1 3480 3480 3680 3680 3680 1161C6C1 3680 1161C6C6 3680 1161C6C6 3740 1160C6C6 3740 1160C6C6 3740 1160C6C6 3740 1160C6C6 3740 1160C6C6 3740 1160C6C6 3740 1160C6C6 3740 1160C6C6 3740 1160C6C6 3740 1160C6C6 3740 1160C6C6 1160C6C6 1160C6C6 1160C6C6 1160C6C6 1160C6C6 1160C6C6 1160C6C6 1160C6C6 1160C6 11	3360 3360 10000 1000 1000 1000 1000 1000 1000 1000 1000 1000 1000	3370 3370 3370 3370 360600000 36000000 36060000000000000000000000000000000000	CGGGAGA 3380 3380 3380 3380 3380 3380 3380 338
T, vivax Bostaurus Honosapiens Concensus T, vivax Bostaurus Honosapiens Concensus T, vivax Honosapiens Concensus T, vivax Bostaurus Honosapiens Consensus T, vivax Bostaurus Honosapiens Consensus T, vivax Bostaurus Honosapiens Consensus	32511 1	3260 TCCGGATCAT TCCGGATCAT TCCGGATCATCAT TCCGGATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCA	3270 TCCTACATCG CCTACATCG	3280 CCTRICGENE CTITICENE CTITICENE CONTRICTIONE CONTRICT	2290 GEGCCACCTT GEGCCAGC GEGCCACCTT GEGCCAGG GEGCCACCTG GEGCCAGG G	3300 3300 3300 3300 3300 3300 3300 3300 3300 3300 3300 3300 3300 3430 3430 3430 3430 3430 3500 3500 3500 3560 3690 3690 3820 3820 3830 3950	ancancan. 3310 TEG TEGREGA TEG TEGREGA TEG TEGREGA GET GET GENERAL GET GET GENERAL GET GET GENERAL GET GET GENERAL 3570 	3320 CRACCACGA CRACCACGAN CRACCACGAN CRACCACGAN CRACCACGAN CRACCACGAN CRACCACGAN CRACCACGAN CRACCACCA CRACCACGAN CRACCACCA CRACCACGAN CRACCACCA CRACCACGAN CRACCACCACA CRACCACGAN CRACCACACACACACACA CRACCACACACACACACACACACACACACACACACACAC	3330 3330 SARA	A Constant of the second secon	3350 3350 116CTCCCF1 116CTCCCF1 117CTCCCF1 117CTCCCF1 117CTCCCF1 117CTCCCF1 117CTCCCF1 3480 3480 3680 3680 3680 3740 3740 3740 3740 3740 3740 3740 374	3360 3360 3360 3360 3360 3360 10000 1000 1000 1000 1000 1000 1000 1000 1000 1000 1000	3370 3370 3370 3370 360600000 3606000000 360600000000 36060000000000000000000000000000000000	CG666A9 3380 3380 3380 3380 3380 3380 3380 338
	4421	4430	4440	4450	4460	4470	4480	4490	4500	4510	4520	4530	4540	4550
---------------------------------------	--------------------------	--------------------------	--	--	---	--	--------------------------	--	--	--------------------------	--	---	--	----------------------
T.vivax Bost aucus	GCTCT GOTOD		ACACAGCATC		AG-GGGGCCCF		TTTACTGGA		TGTTGGCGAAA TGTATTCTAAG					CCAAGAA
Homosapiens Consensus	GATCA	CCATGTTGG	AAGCAGCA-C AagCAGCA.C	TGGGACTTG	AGCGAGCTCF	CATGGGAATG	TTTACTGAA TTLACLGaA	TAGCTATTC TaGctaTTC	TATACTETAAA TeTa.tCtAAa	TTAAGCCT LLAaGCCL	CAGAAAAATGAC AgAAAATgac	GGAGCACCTG	AGCTGTTCT	GGTCTAG
oonoonouo	4551	4560	4570	4580	4590	4600	4610	4620	4630	4640	4650	4660	4670	4680
T.vivax	I GATC <mark>A</mark>	нтасасата	ANATGATTGC	T <mark>gc</mark> atgt <mark>ga</mark>	G <mark>a</mark> gta <mark>tcat</mark>		TG <mark>CT</mark> TCGAG	TTTACATGT	CAACAACGAGG	ттостто	CTGCCGCCACC	ACGATGATGC	CCACCACGT	CGATGCC
Bostaurus Homosapiens	agtga Agtga	ATATTCCTA ATATTCCCA	AGGTGCTAAG Aggtgctaag	AGCTGCAGA AGCTGCAGA	ICAAGCCCAT ICAAGCTCAT	ICTTTGG <mark>GCA</mark> G ICTTTGG <mark>GCA</mark> G	AATTGGTGT AACTGGTGT	ITTT <mark>GT</mark> ATGA	CAA <mark>ATAC</mark> GAAGA CAA <mark>G</mark> TATGAAGA	ATATGATA	ATGCCATAAT ATGCCATAAT	ACCATGATGA ACCATGATGA	TCATCCTAC	TGATGCA Tgatgcc
Consensus	agTgA	ATALLColAI	AggTGcTaag	aGCtgcaGA	acflagctCA1	ICTLTGGgcaG	aacTggtgt	ITTTgtATGal	CAA.tAcGAaGI	laTatgaTaa	aTGCCataAtt	ACCATGATGa	atCAtCc.ac	LGATGCC
T	4681	4690	4/00	4/10	4/20	4/30				4770	4/80	4/30		4810
Bostaurus	TGGAA	AGAAGGGCA	GTTCAAAGAC	ATCATTACC	AGGTTGCCF	ATGTGGAGCT	ATACTACAG	ICCANTACAA ICCANTACAA ICCANTACAA	TTCTACTTAGA	TTCAAGCC	RCTGTTGTTA	ATGATTTGCT	ATGGTGCTG	TCTCCAC
Consensus	TGGaA	agAaGggca	.TTCAAagat	aTcaTtAcc	AggTtGcca	atgtgGA.cT	atacTACAg	gCaATaCaa	TTCTACt TagAl	ILLCAAgCC.	aCtgtTgtTaa	ALGALTTECTE	AtggtgcTG	TcTccac
	4811 	4820	4830	4840	4850	4860	4870	4880	4890	4900	4910	4920	4930	4940
T.vivax Bostaurus	CGTTG GGTTG	GACCCCGAG GACCATACT	CGTGTCTTGC CGTG <mark>CAGTCA</mark>	TGGAGGTGA ATTATTTCA	AGAAGCTCGC SCAAG <mark>GTTA</mark> F	CCCTGTGCAC	TTTATTCGT CTGGTGAAA	CONTRACTOR	AGTCTGCCCAGO GTTCAGTTCAGO	AACGCAAC	TCCAGACGTG1 HACAAATCTG1	GAATGAGGCA GAATGAGTCA	TTAACAAGC T <mark>G</mark> AACAACC	TATATAT TCTTTAT
Homosapiens Consensus	GGTTG gGTTG	GATCACACT GAcCacact	CGTGCAGTCA CGTGcagTca	ATTATTICA attAttTcA	SCAAGGTTAF gcAAGgTtaa	ACAGCTACCA aCagcTaCc.	cTGGTGAAAA cTggTgaaal	CGTATTTGC CcgTATtTGC	GTTCAGTTCAG gtTCaGttCAG	IACCATAACI ACCacAACi	AACAAATCTG1 aaCAaAtcTG1	GAATGAATCA GAATGA <mark>gl</mark> CA,	T <mark>GAACAATC</mark> T <mark>B</mark> AACAA.C	TTTTTAT T.T.T.TAT
	4941	4950	4960	4970	4980	4990	5000	5010	5020	5030	5040	5050	5060	5070
T.vivax Bostaurus		AAGAGGACT AAGAAGATT	TCACTOCTTT	GCGTGACTC GAGAACATC	TGTGGAGCGC GATAGATGCT	TTTGACAACT	TTGACTCCG	CAGAATTAAG	TECTERECTTE	-AAAAGATGO AAAAGCATO	GAGCTTTTTGF GAACTCATTGF	IGTTCCGCAAGA		ТТСТССА АССТСТТ
Homosapiens Consensus	TACAG LacaG	AAGAAGATTI AAGAaGALT	ATCAGGCTCT atcagGCTcT	GCGAACATCI GcGaacaTC	ATAGATGC1 .aTaGAtgct	TATGACAACT Tatgacaact	TTGACAATA TTGACaata	CTCGCTT-G	CTCAGCGTTTG ctCaGcGtTTG	GAAAAACAT(GAAAAgcat(GAACT <mark>CA</mark> TTGF GAaCT <mark>ca</mark> TTGF	IGTTC <mark>A</mark> GGA <mark>GA</mark> IGTTCaG ₊ Agaf	ATTGC <mark>TGC</mark> TT ATTGC <mark>tgc</mark> TT	ATCTCTT
	5071	5080	5090	5100	5110	5120	5130	5140	5150	5160	5170	5180	5190	5200
T.vivax	TCGCC	GTAACAAGC	GATTTACACA	TGCCATTGC	CGTGGCGAAC	GAGAACAAAC	TCTACCAGG	тессаттеа	RACTGCCGCCG	GAGTGCCA	ACCCGCAGATI	GTAGAGGATC	TCTGGACT-	TITITG
Homosapiens	CAAAG		GCTGGAAACA GCTGGAAAACA	GAGTGTAGA	SCTGTGCAAG	AAAGACAGCC	TTTACAAGG	TGCAATGCA	GTATGCTTCTG	ATCTAAAG	ATACTGAATTC	GCTGAAGAACT	CCTGCAGTG	GTTTTTG
consenses	5201	5210	5220	5230	5240	5250	5260	5270	5280	5290	5300	5310	5320	5330
T.vivax	 ТТ <mark>6</mark> -Т	GGATCACCC	GAGTGCTTT	GTTECCTET	CTTTACACAT	ICCTACGACTA	CCTCACACC	ICAGGTCGTG	ATGGAAAAGGCA	TGGCTCAA	CAAGCGTACGO	ACCTCGCCATO	CCGTACTTT	ATTCAGG
Bostaurus Homosapiens	CAGGA	AGAAAAAAAG Agaaaaaaaa	AGAGTGCTTT Agagtgcttt	GCAGCATGT GCAGCTTGT	TGTTTACT	IGTTATGATCT Igttacgatct	TTAAGGCC	IGATGTTGTC IGATGTCGTC	CT <mark>g</mark> gaaa <mark>c</mark> tgci Ct a gaaa <mark>c</mark> tgci	ITGG <mark>AGGC</mark> A	CAATATCATGO CAATATCATGO	ATTTTGCCAT	CCCTACTTC CCCTATTTC	ATCCAAG ATCCAGG
Consensus	Caliga 5221	abHaaHaaga	5250	5260	E270	E290	E290	1gHtGIcGIco	E410	F490	E420	F440	E450	FACO
Tuiuav		0040 CAAGAATACI	5550 T288878878	+ T	+			0000	0110 0100 0100000TR	3420 +	102PC	0440 10010080100	00PC	
Bostaurus Homosapiens	TCATG TCATG	AAGGAATAC AAGGAGTAC	TTGACAAAGG TTGACAAAGG	TGGATAAAT TGGATAAAT	ragatgette ragatgette	AGAATCACTG	ngaaaagaga Ngaaaagaa	GAAGAACAAG GAAGAACAAG	CTACGGAGACAC CTACAGAGACAC	AACCTATTO AACCCATTO	GTTTATGGTCF GTTTATGGTCF	GCCCCAGCTG	TGCTGACAG	CAGGACC
Consensus	TCAT	aAgGAaTACI	ttgACAAAGg	Tggataaati	lagatgette	agaATCaCtg	agaaAaGaal	GAAGaaCAaGo	cTacgGAgaCal	CAACc.aTtl	GtttAtGgtca	GCCccaGctGa	atGetGaCaG	iCa6gAcc
. .	5461 	5470	5480	5490	5500	5510	5520	5530	5540	5550	5560	5570	5580	5590
Bostaurus		TGCAGTCC	CTCCCCAGGC		CTATEGTTAC			IGCCTCAGCC	TGGCTTTGGGT	CAGCATGT		CTGATCCTGT	GTCGCCTAT	TTTCGTA
Consensus	CaG.g	tTGCagtcc	ctCCcCaGgc	.cc.ttTGg	TatgGtta.	.aCcgcaccfic	CctAtGGgC	aGCc.caGCcl	tgGCtttgGgtf	lcaGCatgT	Gagatg.Aa.(CtGATcCtgta	GLcgccTat	TtTcgta
	5591 	5600	5610	5620	5630	5640	5650	5660	5670	5680	5690	5700	5710	5720
l.vivax Bostaurus	CCGAA	ACATCGTCT		CTCAGTTTA	AACAGGGG	AAACAGACA-	CATGTTCTT	ТААССТТТА	TTTCATGAAGG	СТАСТТТТ	TGTTTCTAAC	TATAAACTCG	ATCACCTAT	GTTTAAA
Consensus	CcgAa	aCAtcgtCt.	.TaCcC.Ctt	CLCAGTTTa	taagggGf	laAACAGgca.(C.LGTLCTL	itaaccttta	tttcatgaagga	ct.ctttt	t.gtttctaad	tataaact.g	atcacctat	gtt.aaa
	5721 	5730	5740	5750	5760	5770	5780	5790	5800	5810	5820	5830	5840	5850 1
T.vivax Bostaurus	GCTTA	TTTCACATT	CCGCATCATT	TTAGAATTT	TTTTCARAG	GGGAATAGTT	TCAATGCTT	TATTCACTT	GGGCTTTTCTT	TTCCCCCC	CATTCTTTC		ATACTCAAT	CTATTGT
Consensus	.ctta	ttcacatt	cc.catcatt	ttagaattta	atttc.aag	ggggaatagtti	tcaatg.ttl	tattcactt	gggctttt.tt	ttccccc.	tc.ttcttt.a	agaactgct.	ata,tcaat	ct.ttgt
	5851	5860	5870	5880	5890	5900	5910	5920	5930	5940	5950	5960	5970	5980
T.vivax Bostaurus	GAAGA	ACCTGATTT	GCACTCTGTA	GTGTTTAAA	GAAAAAAAA	алалаластс	ТААТАТТБА	тстсттала	TTTAGTGTATG	FAAACAGCTI	TACAG-TATG1	ATTGTCTAAAT	IGCATTTAAA	тстсттт
Homosapiens Consensus	GAAGA gaaga	ACCTGATTT acctgattt	GCACTCTGTA gcactctgta	GTGTTTAAA gtgtttaaa	GAAAAC 8aaa.	CAAAGAAACTC aaa.aaactcl	TAATATTGA Laatattga	HTCTCTTAAA atctcttaaal	TTTAGTGTATG Lttagtgtatgt	TAAACAGCT aaacagctl	TACAAATACGI tacata.gt	ATTGTCTAAA attgtctaaat	GCATTTAAA .gcatttaaa	CTGTTT tct.ttt
	5981	5990	6000	6010	6020	6030	6040	6050	6060	6070	6080	6090	6100	6110
T.vivax Bostaurus	тсттс	AAAGAAAAG	CCTARAGCCA	ААААТАСТС	STATATGACO	ATGCAAGACT	GTCAATGCC	ACAAAGACA	ACACTAATGAG	ATATCCTC	CGTGGGATCGC	AGTGCTCTCC	AATTGTTTA	AAAAATG
Honosapiens Consensus	TATTC	AAAGAAAAAG aaagaaaag	C-TAAAGC-A c.taaagc.a	AAAACACTG aaaa,actg	GCATATGACC g.atatgacc	CATGCAAGACT atgcaagact	GTCAGTGCCI gtca.tgcca	ACAAAGACAA acaaagacaa	ACACTAATCAGO acactaat.ago	CACATCGTA	CACTGGATTGC cggat.gc	AGTGCTTCCCF	GATTATT-G	AAAAATG aaaaatg
	6111	6120	6130	6140	6150	6160	6170	6180	6190	6200	6210	6220	6230	6240
T.vivax Bost.aurus	Сатта		тесстенстт	ттааатсас	атаваасс	сстстаясст	ATECAGETT	ССТСАТТАС	GCATATAGAAAA	тастаат-	GTTTTGCTCF	сттентатат	асабатасс	CTTACGT
Homosapiens Consensus	TTA	CAGACAACT cagacaact	TGCCTGATTT tgcctga.tt	TTAAATGAG LLaaalgag	CGTAAAAGGC .taaaaggc	CCTCTAACCT	ATGCAGGTT atgcaggtt	CCCCATTAT	GCATATAGAAAA gcatatagaaa	TGCTAGTA	IGTTTTGCTCF	CTTCATATGT	ACAGGTGCC acaggtgcc	CTTATGT ctta.gt
	6241	6250	6260	6270	6280	6290	6300	6310	6320	6330	6340	6350	6360	6370
T.vivax Boot aucus	TETEC	TETOTOTO	+		тесоттео									
Homosapiens	TGTGC	TGTATCCTG		GTGGGACCA et.gggaccal	TCCATTCA	GAGCAAAGAG		CCAATCTTG	TGTGTGTGTTTAC	AACCCTTC	CCTGAGGTTTC	TGTATGTTGG	TATTGTGGT	GTTTTAG
	6371	6380	6390	6400	6410	6420	6430	6440	6450	6460	6470	6480	6490	6500
T.vivax	0.1000	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1
Honosapiens	ATCAC	TGAGTGTAC	AGAAGAGAGAGA	ААТТСАААСІ	алататтас	TGTTCTTCAG	TTTTGTTTG	rggaatttgai	RATTACTCARA	ТТААААТА	RATTACTGGAC	TGTGGAAATAA	САТАБААТТ	GAAGTTT
	6501	6510	6520	6530	6540	6550	6560	6570	6580	6590	6600	6610	6620	6630
T.vivax		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1
Bostaurus Homosapiens Consensus	TAATT	AAATACCAC	TCAAACGAAA	AGAACAGTA	GTTTTTGTAG	STTTTATATTG	GATACTGAG	GCATTAGGGA	GGCATGAAAGGA	AGAGGAAT	GAGGATTGAGA	ICATGTGAAGAG	CATTGTGCAT	ТАТАТСА
consensus	6631	6640	6650	6660	6670	6680	6690	6700	6710	6720	6730	6740	6750	6760
T.vivax	1	+		+			+				+		+	1
Bostaurus Honosapiens	ATGTG	CATTCCTGTI	AGTTCATTAA	CAAGGTACA	FGCAATAGTO	TAAAGAACCA	GAGTCACTA	CTATAGTGGC	ттаасатттаа	гстатстсси	RATATTTAAC	CAAGTGACACO	GAGGTTTTT	ATCGAAG
CONSENSUS	 6761	6770	6780	6790	6800	6810	6820	6830	6840	6850	6860	6870	6880	6890
T.vivax	1	+		+		+	+	+		+	+	·	+	1
Bostaurus Homosapiens	CATT	CACTTAAAT	GAACAAATCA	TGGCTGTTA	TATTAACTTO	алаталата	TATTTAAACI	ITGTAGTTAA	CATGCTCTTTC	ICATCATGA	ATTATAAAGG1	GCCCAAATTA	IGGGTATCTT	GATTTTT
CONSCIISUS														

	6761 	6770	6780	6790	6800	6810	6820	6830	6840	6850	6860	6870	6880	6890
T.vivax Bostaurus Homosapiens Consensus	CATTI	CACTTAAAT	GAACAAATCA	TGGCTGTTA	TATTAACTTGF	алаталалта	TATTTAAACA	TGTAGTTAAC	ATGCTCTTTC	TCATCATGAR	ITTATAAAGGT	GCCCAAATTA	TGGGTATCTT	GATTTT
conscilsus	6891	6900	6910	6920	6930	6940	6950	6960	6970	6980	6990	7000	7010	7020
T₊vivax Bostaurus Homosapiens Consensus	TTCAR	AAATTGGTTI	GTGTGAATCC	AGCTCTTGC	TTATGGCTGAG	AATGTTCCT	AAAGTTCATT	тсастатссс	ттаатсстса	ATAGCTACAC	атассссстт	GCCTAGTTAG	TCTTGCACTG	CTTTACA
	7021	7030	7040	7050	7060	7070	7080	7090	7100	7110	7120	7130	7140	7150
T.vivax Bostaurus Homosapiens Consensus	АСТСТ	CTTAGGCAA	ATTACCTAAC	ATAAGCTCCI	ACAGAAGAGTT	ттттаааас	ттаяаятссс	TGTCCCACCA	66TGT66T66	стсатбсстб	TAATCCCAGC	ACTTTGGGAG	GCTGAGGCAG	GCGGATT
	7151 	7160	7170	7180	7190	7200	7210	7220	7230	7240	7250	7260	7270	7280
T.vivax Bostaurus Homosapiens Consensus	GCTTG	AGGCCAGGA	GTTCGAGACA	AGCCTGACCI	AACATGGTGAC	CTCCATCTCT	ACTAAAAATA	AAAAATCAGC	CAGGTGTGAT	GGTGGATGCC	TATAAGATCC	TAGCTGCTAC	TCAGGAGGCA	GGAGGCT
	7281 	7290	7300	7310	7320	7330	7340	7350	7360	7370	7380	7390	7400	7410
T.vivax Bostaurus Homosapiens Consensus	GAGGC	ATGAGAATCI	ACTTGAACCT	GTGAGGCAAI	AGGTTGTAGTO	GAGCCAAGAT	CACGTCACTG	CACTCCATCC	TGGGTGACAG	AATGAGACTC	TTGTCTCAAA	AAACAAAAAA	ACCTATTTAG	TTTCATC
	7411 	7420	7430	7440	7450	7460	7470	7480	7490	7500	7510	7520	7530	7540
T.vivax Bostaurus Honosapiens Consensus	CAGGA	ICATTAAGTGI	AAGTGTTTA	ATGTGAGTG	CAGGTCAGTGF	AGAATACAA	TGGTGCCCCT	GCTTTGATTT	GTGGGAGGTG	CCATCAGTTT	TCCCCACCAC	TGCTTTTGCA	CCCTCAGTGC	RAATATC
	7541 	7550	7560	7570	7580	7590	7600	7610	7620	7630	7640	7650	7660	7670
T.vivax Bostaurus Honosapiens Consensus	AACAC	agagaaaaa	10000	ATAGTATTA	TGAAAACATTO	ACTCTGTGG	AGACCCTGTG	GGTTCTGCAG	AGTATACTTT	GAAAACTATA	IAGATTATGAG	TTCTATAAAA	TACCAAGTAC	AGATGAA
	7671 	7680	7690	7700	7710	7720	7730	7740	7750	7760	7770	7780	7790	7800
T₊vivax Bostaurus Homosapiens Consensus	CTAGA	iaaacaagca	TATATCCACA	ATTACCAGA	ATTTTCATAGI	IATTCCTTTT	AGTAGATATG	CCATGACAGT	TACTTAGCCA	CCCCATGCCA	ITCCTGTTGGG	AATGCCACTA	CCTTTGAATT	TGGAGCC
	7801 	7810	7820	7830	7840	7850	7860	7870	7880	7890	7900	7910	7920	7930
T.vivax Bostaurus Homosapiens Consensus	ATCAG	ITCTATCTGA	GCAAACCTC	AGAAATTAC	CTGAGCCAGAF	TCATGCACT	TAGCACTGAG		TCTTAACGTT	GCATTTTGTT	GCATCACTTT	TGCAGCCAGT	AAACATTCTG	TTTAGAA
	7931	7940	7950	7960	7970	7980	7990	8000	8010	8020	8030	8040	8050	8060
T.vivax Bostaurus Honosapiens Consensus	ATAGT	TGCTATTGT	GCATCATTC	ACAGTTGCA	ATTTTTCTCCT	IGTGCTGTCA	TATGCCTGTG	CGAAGTGTAT	TAAATGAATC	AAATATTAGA	IAATTTCAAGG	CTGTCTTTAG	TGTTCTGCCC	ACAATAC
	8061 	8070	8080	8090	8100	8110	8120	8130	8140	8150	8160	8170	8180	8190
T.vivax Bostaurus Homosapiens Consensus														
	тссас	CAATGACCT	FAGACCTTGA	GATGGTGCTI	ATAACGCTGCT	TATATTGCA	GTTAACCATA	GAGAGGTGGA	GCCACTTAAA	ATGGGCCTAT	TACCAAAATT	CTCCCTGGCA	TCATTACAGT	TCTTGGG
	TCCAC 8191 I	CAATGACCT 8200	RAGACCTTGA 8210	GATGGTGCTI 8220	8230	8240	GTTAACCATA 8250	GAGAGGTGGA 8260	6CCACTTAAA 8270	8280	TACCAAAATT 8290	CTCCCTGGCA 8300	8310	8320
T.vivax Bostaurus Honosapiens Consensus	TCCAC 8191 I GATAC	200 8200 ACTGATTTT	RAGACCTTGA 8210 HGARATTACT	GATGGTGCTI 8220 GTCAGTATCI	ATAACGCTGCT 8230 CTCCTAAAAGF	8240 11AGGCTTAAA	GTTAACCATA 8250 TAGTTTCTAA	GAGAGGTGGA 8260 Caagatgact	BCCACTTAAA 8270 ATCAGGAAGC	8280 +	TACCAAAATT 8290 	CTCCCTGGCA 8300 GACCCTCTGC	TCATTACAGT 8310 	8320 1
T.vivax Bostaurus Homosapiens Consensus	TCCAC 8191 I GATAC 8321	8200 8200 8200 8200 8200 8200	RGACCTTGA 8210 RGARATTACT 8340	GATGGTGCTI 8220 GTCAGTATCI 8350	8230 8230 CTCCTAAAAGF 8360	17ATATTGCA 8240 1AGGCTTAAA 8370	GTTAACCATA 8250 TAGTTTCTAA 8380	GAGAGGTGGA 8260 Cragatgact 8390	BCCACTTAAA 8270 ATCAGGAAGC 8400	8280 8280 TATGTGGCT1 8410	TACCAAAATT 8290 GGGGAAGTTGG 8420	8300 6ACCCTCTGC 8430	ТСАТТАСАБТ 8310 	8320 8320 1 666TAAC 8450
T.vivax Bostaurus Honosapiens Consensus T.vivax Bostaurus Honosapiens Consensus	TCCAC 8191 I 6ATAC 8321 I TGGTA	200 8200 200 200 200 200 200 200 200 200	8210 8210 	GATGGTGCTI 8220 GTCAGTATCO 8350 ATTGTATCAI	ATAACGCTGCT 8230 CTCCTAAAAAG 8360 AGTGTATCTAA	17ATATTGCA 8240 1AGGCTTAAA 8370 1AGATCAAAA	GTTAACCATA 8250 TAGTTTCTAA 8380 GGGAAAAAAG	GAGAGGTGGA 8260 CAAGATGACT 8390 GCACCCTTAA	GCCACTTAAA 8270 Atcaggaagc 8400 	ATGGGCCTAT 8280 TATGTGGCTT 8410 TAGTTCTAGG	TACCARAATT 8290 GGGGAAGTTGG 8420 	CTCCCTGGCA 8300 GRCCCTCTGC 8430 AGCAGGGATG	TCATTACAGT 8310 CTCATATTCT 8440 ACAAACTACG	8320 8320 1 666TAAC 8450 1 TTCACTT
T, vivax Bostaurus Honosapiens Consensus T, vivax Bostaurus Honosapiens Consensus	TCCAC 8191 I 6ATAC 8321 I TGGTA 8451	200 8200 200 200 200 200 200 200 200 200	REGACCTTER 8210 REGARETTECT 8340 RETTETTEE 8470	GATGGTGCTI 8220 GTCAGTATCI 8350 ATTGTATCAI 8480	ATAACGCTGCT 8230 CTCCTAAAAAGF 8360 Agtgtatctaf 8490	11ATATTGCA 8240 1AGGCTTAAA 8370 1AGATCAAAA 8500	GTTAACCATA 8250 TAGTTTCTAA 8380 GGGAAAAAAA 8510	GAGAGGTGGA 8260 CAAGATGACT 8390 GCACCCTTAA 8520	GCCACTTAAA 8270 ATCAGGAAGC 8400 TTGTCAAAGT 8530	ATGGGCCTAT 8280 TATGTGGCTT 8410 TAGTTCTAGG 8540	TACCARRATT 8290 66666A6TT66 8420 8420 8420	CTCCCTGGCA 8300 GACCCTCTGC 8430 AGCAGGGATG 8560	ТСАТТАСАВТ 8310 СТСАТАТТСТ 8440 АСАААСТАСБ 8570	TCTTGGG 8320 1 GGGTAAC 8450 1 TTCACTT 8580 1
T.vivax Bostaurus Honosapiens Consensus T.vivax Bostaurus Honosapiens Consensus T.vivax Bostaurus Honosapiens Consensus	TCCAC 8191 I 6ATAC 8321 I TGGTA 8451 I 8451 I TACAG	CARTGACCT 8200 CACTGATTTT 8330 TAACATAGTI 8460	RAGACCTTGA 8210 AGAARTTACT 8340 AATTATTAGG 8470 ATTCTTACTT	GATGGTGCTA 8220 GTCAGTATCC 8350 ATTGTATCA 8480 GGGCCCACCC	ATARCGC TGCT 8230 CTCC TARARAGE 8360 8360 8490 CATTTCCATC1	17474776CA 8240 NAGGCTTARA 8370 NAGATCARAR 8500	GTTAACCATA 8250 TAGTTTCTAA 8380 GGGAAAAAAAA 8510 CATAAAGGTTA	6AGAGGTGGA 8260 CARGATGACT 8390 6CRCCCTTAR 8520 CTCRAGTTTC	GCCACTTAAA 8270 ATCAGGAAGC 8400 TTGTCAAAAGT 8530 AGTGGCTTCA	ATGGGCCTAT 8280 TATGTGGGCTT 8410 TAGTTCTAGG 8540 TTGTTACAAG	TACCARARTT 8290 6666A6TTG6 8420 8420 8420 8420 8420 8420 8420	CTCCCTGGCA 8300 GRCCCTCTGC 8430 AGCAGGGATG 8560 RGTGAGAAAAC	TCATTACAGT 8310 CTCATATTCT 8440 ACAAACTACG 8570 TTTAATAGGC	TCTT6GG 8320 1 GGGTAAC 8450 1 TTCACTT
T.vivax Bostaurus Konosapiens Consensus T.vivax Bostaurus Honosapiens Consensus T.vivax Bostaurus Honosapiens Consensus	TCCAC 8191 I 8321 I TGGTA 8451 I TACAG 8581 I	CARTGRCCT 8200 CRCTGRTTTTT 8330 1TARCRTRGT 8460 5TACCRTRR 8590	RAGACCTTGA 8210 AGAAATTACT 8340 AATTATTAGG 8470 ATTCTTACTT 8500	GATGGTGCTT 8220 GTCAGTATC 8350 ATTGTATCA 8480 GGGCCCACCC 8610	ATAACGCTGCT 8230 CTCCTAAAAAGA 8360 AGTGTATCTAA 8490 CATTTCCATCT 8620	17474776CA 8240 ANG6CTTAAA 8370 ANGATCAAAA 8500 (611AAG6TC 8630	GTTAACCATA 8250 TAGTTTCTAA 8380 GGGAAAAAAA 8510 CATAAGGTTA 8640	GAGAGGTGGA 8260 CARGATGACT 8390 GCACCCTTAA 8520 CTCAAGTTTC 8650	GCCACTTAAA 8270 ATCAGGAAGC 8400 TTGTCAAAGT 8530 AGTGGCTTCA 8660	RTGGGCCTAT 8280 TATGTGGGCTT 8410 TAGTTCTAGG 8540 TTGTTACAGG 8541 	TACCABARTT 8290 6666A6TT66 8420 8420 8420 8420 8420 8420 8420 8420	CTCCCTGGCA 8300 GACCCTCTGC 8430 AGCAGGGATG 8550 AGTGAGAAAAC	TCATTACAGT 8310 CTCATATTCT 8440 ACRAACTACG 8570 TTTAATAGGC	TCTTGGG 8320 1 GGGTAAC 8450 1 TTCACTT 8580 1 TGTGATT

Bostaurus Honsapiens Consensus

Anexo 6. Secuencia aminoácidica la CLH. En rojo se resalta la secuencia peptidica parcial de la región N-terminal de la CLH.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
conoleta clonada	MDGPI	SFAEVFQLN	SVAGGLQPGF	ISFKTLTLES	SDKYYCYRDY	QPDGQTSLVI	DLEGRESIR	NNYRDADSAI	MNPRSKILAI	RSGRNLQIYO	MDAAKRLKAA	RFDEDYVFWTI	IVDERTVGIV	SNSAYHH
Lonsensus			450	450	470	400	400							
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	1
comoleta clonada Consensus	H5LDG		• UKHPELNGP	4YQ1L5TQ1DE	NKKALALUG HLCG	ISRGTEGTVG ISRGTEGTVG ISRGTEGTVG	(TQLFSVENN (TQLFSVENN (TQLFSVENN	SGRYLEGNAG SGRYLEGNAG SGRYLEGNAG	TFISTSIPTO	PRSCNVHULH PRSCNVHULA PRSCNVHULA	MNNPTQGGKVI MNNPTQGGKVI MNNPTQGGKVI	LINELPINPKI LINELPIAPKI LINELPIAPKI	IDYSLQRRYY 1DYSLQRRYY 1DYSLQRRYY	DYPFPAG DYPFPAG DYPFPAG
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
comoleta clonada	DFPVA	LHYSPRHKL LHYSPRHKL	LTVVTGHGSL LTVVTGHGSL	LLHDIFTAV	/IKTQQVSNC /IKTQQVSNC	GVFCGTGYTK1 GVFCGTGYTK1	IGGILCYNAQ Iggilcynaq	GSVFHVSPND GSVFHVSPND	NAIVPFVKNQ NAIVPFVKNQ	LQNPELALRI	agsanlggydi	DLYRYKLENSI	RAGDVEEAV	RTCLRAP
consensus	001		LIVYIONOSL		TK LEGA DHC		GOTECANNO	USYFRYSFND		400				
	391	400	410	420		440	450		470	480	490	500	510	
comoleta clonada Consensus	NNHLR	VPEVENREV	HAPQAHGQQF	7HISTYFKIVL	-HETSLNKHE	SVELHRHILP	KGGINYYKLŲ	YDEDKL IPSE		PELHLK1FHK		LLUKNETUKH	·ETUKRHGFS	PNHRUIL
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
comoleta clonada	NSFIH	Instituning on a state of the s												
Lonsensus														
	651	+	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	+	1
comoleta clonada Consensus	NIRRC	FSHAHNFNP	ENYMEFFGKL	SQTDSHKCLE	EDLLRNHHQH	FKYIYQLATKY	/NDALGSDKL	IELFLEHKLY	DILYYYLGAI	VPYTRDAEVH	YRYIEAAAEY	GQYQELERHTI	ESPCYDPER	TLTLLKN
	781	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
conoleta	KKHAD	LHPLINICD	QHNFIDDLYF	YLIETRNESL	IEQYVQRRS	PSKTPAVVGAL	IDCNYQEAF	IKSLLLSYGT	HCPVAELVEV	VEQRGRLRLI	ETHLEMRYAEI	KKTDEPLHNAI	AKLYVLTGM	APEKFLT
clonada Consensus		•••••	•••••			•••••		•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	• • • • • • • • • • •	•••••
	911 	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
comoleta clonada Consensus	ENEYY	NPLVIGKYC	ENRDPHLSYI	EAYRRGCLSNE	ELIEITSKNG	MAKQLARYLVO	QKNLELHAT	VLKGEGIDRD	RLVEAVQQTA	LPESEVTEEV	STTVRAFMNA	ELTEELVSILI	JQIYYCGRFR	KNRFLEN
	1041	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
conoleta	LLIMS	AVRSRKNKV	MEYVSTLENY	DAKEVAGNCS	SEGNFEAAF	TVYDKFEMPVE	AARYLMHDH	KDIPRGRLYA	ORCOMPSVHS	VLGEALLAAD		RAKNHSCYDS	/IAAAERNNQ	YGDLIKY
clonada Consensus														
	1171	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
comolet a		OESHGEESK				VHTVORKCEN		VSTSHNEHKI		PERVERANKS		OCVEOKENK		
clonada Consensus		•••••				•••••				••••••	•••••	•••••		
	1301	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430
comoleta clonada														
consensus				4 460			4 400	4500	4540	4500	4520	45.40	4550	4500
	1431	1440	1430	1460	1470	1480	1490	1300	1510	1520	1530	1340	1550	1560
comoleta clonada Consensus	SPULL	QULLSSLFK		YKHYHSYHLJ	LHUYLEIYUN	KNHKLINEHLI	IEF YYEEENF	THERHSTENT	NNFUSHELTH	KLEKMELLEF	KETHELEHKK	NKSTHYHNIYI	IKESKL TUEH	
	1561	1570	1580	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690
comoleta clonada	KDISV	VEDLLDFFV	VDHPECFVTC	LYYCYDLLTF	PQLYLEKAHL	NKCHDIAHPYI	IQSIQDYTS	RVIRIEKSHS	EAHESGKETE	RRSGQPFMAG	NDPLHIQAGP	avsaapsmaqi	QQPHGYGHH	PQGGHAG
Consensus	•••••	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • •	•••••	•••••	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • •	•••••	•••••	•••••	•••••
conoleta	1691 GALYG	1699 NGVF												
clonada Consensus														