



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

“Identificación y caracterización de proteínas específicas del nematode parásito Dioctophyme renale. Búsqueda de marcadores diagnósticos.”

Tesista: Giorello Alejandra Nahili

Directora: Franchini Gisela Raquel

Codirectora: Radman Nilda Ester

Año: 2023

Parte de los resultados presentados en esta tesis fueron publicados en los siguientes artículos:

- Giorello AN, Kennedy MW, Butti MJ, Radman NE, Córscico B, Franchini GR. **Identification and characterization of the major pseudocoelomic proteins of the giant kidney worm, *Diectophyme renale*.** Parasit Vectors. 2017 Sep 27;10(1):446. doi: 10.1186/s13071-017-2388-x. PMID: 28954629; PMCID: PMC5615634. Giorello
- Butti MJ, Gamboa MI, Terminiello JD, Franchini GR, Giorello AN, Maldonado LL, Kamenetzky L, Luna MF, Lopez Merlo M, Radman NE. ***Diectophyme renale* in a domestic cat (*Felis catus*): Renal location and nephrectomy.** Vet Parasitol Reg Stud Reports. 2019 Dec; 18:100339. doi: 10.1016/j.vprsr.2019.100339. Epub 2019 Nov 2. PMID: 31796187
- Lombardo JF, Pórfido JL, Sisti MS, Giorello AN, Rodríguez S, Córscico B, Franchini GR. **Function of lipid binding proteins of parasitic helminths: still a long road.** Parasitol Res. 2022 Apr;121(4):1117-1129. doi: 10.1007/s00436-022-07463-1. Epub 2022 Feb 16. PMID: 35169885.

Agradecimientos

Quiero dejar expresado, que este trabajo de Tesis fue posible, gracias al apoyo de muchos seres que intervinieron de diferentes formas, desde mis compañeros felinos, mis amigos y amigas, mi familia, mis compañeros y compañeras de trabajo.

Quiero dejar plasmado también el reconocimiento al apoyo y la ayuda brindada por la Dra. Daniela Pedrassani y el Dr. Malcolm W. Kennedy.

Y a la Dra. Gisela Raquel Franchini, por trascender su rol como directora de tesis, y potenciar muchos otros aspectos, que hoy también me componen.

Índice:

Capítulo 1: Consideraciones generales	8
1.1 Biología comparativa	9
1.2 Phylum nematoda	10
1.2.1 Aspectos generales	
1.2.2 Filogenia: lugar de los nematodos en el árbol de la vida	
1.3 El nematode parásito <i>Diectophyme renale</i>	16
1.3.1 Ciclo biológico.	
1.4 Diectofimosis. Situación actual	19
1.5 Hipótesis y objetivos	21
1.4 Bibliografía	22
Capítulo 2: Caracterización del líquido pseudocelómico	26
2.1 introducción al capítulo	27
2.2 Análisis de las proteínas presentes en el líquido pseudocelómico	29
2.3 Purificación de proteínas mayoritarias presentes en el LPC de <i>D. renale</i>	31
2.4 Búsqueda de la identidad de las proteínas p44 y p17	48
2.5 Estudio del poder inmunogénico de las proteínas p44 y p17	51
2.6 Discusión	55
	4

2.7 Bibliografía	60
------------------	----

Capítulo 3: Diversidad genética del nematode <i>D. renale</i>	65
--	-----------

3.1 Estudio de la variabilidad genética utilizando marcadores moleculares	66
---	----

3.2 Bibliografía	69
------------------	----

Capítulo 4: Generando un sólido punto de partida: primeros datos genómicos y proteómicos de <i>Dioctophyme renale</i>	70
--	-----------

4.1 Obtención del genoma de <i>D. renale</i>	71
--	----

4.2 Genoma de <i>D. renale</i> versión 1 (V1)	72
---	----

4.3 Aplicaciones de los datos genómicos: Validación de anotación de proteínas y análisis de la calidad del genoma de <i>D. renale</i>	73
---	----

4.3.1 Predicción de proteínas a partir del genoma V1 (versión 1). Primeras búsquedas	73
--	----

4.3.2 Anotación de p44 en GenBank como Dorilypoforina	77
---	----

4.3.3 Búsqueda de P17, en el proteoma predicho a partir del genoma V1	80
---	----

4.4 Búsqueda del número de cromosomas de <i>D. renale</i>	86
---	----

4.5 Obtención del proteoma de <i>D. renale</i>	89
--	----

4.6 Análisis de los datos proteómicos	91
---------------------------------------	----

4.7 Estudios del metabolismo de <i>D. renale</i> a partir de datos genómicos y proteómicos	109
--	-----

4.8 Resumen del capítulo	126
--------------------------	-----

4.9 Bibliografía	130
------------------	-----

Capítulo 5: En búsqueda de proteínas específicas claves	133
--	------------

5.1 Estudios de ortología	134
---------------------------	-----

5.2 Bibliografía	139
------------------	-----

Capítulo 6: Conclusiones finales	140
---	------------

Apéndices	143
------------------	------------

1. Obtención de muestras de *D. renale*:
2. Purificación de proteínas:
 - Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).
 - Cromatografía de exclusión molecular.
 - Cromatografía en fase reversa (rp-HPLC): separación de los ligandos de las proteínas P44 y P17
 - Liofilización
 - Dicroísmo circular
 - Actividad de unión a lípidos en geles de poliacrilamida nativos
 - Extracción y análisis de lípidos unidos a proteínas
 - Espectrofluorimetría
 - Espectrometría de masas de proteínas y secuenciación de aminoácidos N-terminal
 - Análisis de la reversibilidad de la unión del ligando a la P17
 - Análisis de la unión de hemina comercial con la P17

3. Inmunoensayos:
 - Inmunoensayo desarrollado para la detección de IgG de perro anti-*Dioctophyme renale*.
 - Técnica de dot blot
 - Técnica de Western blot
4. Técnicas de biología molecular:
 - Extracción, amplificación por PCR y secuenciación de ADN
 - Muestras de ADN de *D. renale*
 - Amplificación mediante PCR:
 - Métodos utilizados para el armado de los árboles evolutivos
5. Búsqueda del número de cromosomas de *D. renale*
 - Preparación de la muestra para microscopía:
6. Proteómica:
 - Validación de anotación de proteínas y análisis de la calidad del genoma de *D. renale*
 - Obtención de diferentes homogenatos, provenientes de diferentes tejidos para el análisis proteómico
 - Tratamiento de las muestras para espectrometría de Masa
 - Análisis de los datos proteómicos usando MaxQuant 2.0.3.1
 - Análisis estadístico por pasos en Perseus 1.6.15:
 - Análisis de ortología

Bibliografía

Consideraciones generales

1.1 Biología comparativa

1.2 Phylum Nematoda

1.3 El nematode parásito *Diectophyme renale*

1.4 Diectofimosis, situación actual

1.5 Hipótesis y objetivos

1.1 Biología comparativa

Para poder comprender la zoología en general y la de invertebrados en particular, se deben comprender las bases de la biología comparativa, la cual se encarga de describir las características y patrones de los sistemas vivos y de explicarlos mediante el método científico.

La biología comparativa en su objetivo de comprender la diversidad de organismos en el mundo actual se maneja con tres elementos bien distinguibles: 1) descripciones de organismos, particularmente en términos de similitudes y diferencias en sus características, 2) la historia filogenética de estos organismos a través del tiempo y 3) la historia de distribución de estos organismos en el espacio terrestre. Con todos estos elementos combinados surgen las clasificaciones de los organismos.

De esta manera un esquema de clasificación biológica es el fruto de un conjunto de hipótesis definidas y resumidas por un árbol filogenético. Por ende, las clasificaciones, como otras hipótesis y teorías en ciencia, tienen una tercera función que es la de predicción. Cuanto más precisas y menos ambiguas sean las clasificaciones, mayor será el valor predictivo. Como cualquier otra teoría, las clasificaciones pueden ser sujeto de refutación, refinamiento y crecimiento a medida que nuevos datos se tornan disponibles. Estos nuevos datos pueden estar en la forma de nuevas especies descubiertas o nuevos caracteres de organismos, nuevas herramientas de análisis de caracteres, o nuevas ideas en relación a cómo las características son evaluadas.

De acuerdo con lo antedicho, cambios en las clasificaciones reflejan cambios en nuestra visión y entendimiento del mundo natural.

Si bien en este trabajo de tesis, no se realiza un estudio exclusivo sobre biología comparativa, si, generamos datos que pueden respaldarla y que ayuden a clarificar regiones del árbol taxonómico de nematodos que pueden estar en discusión y/o revisión. Por lo tanto, el trabajo realizado fue pensado para que la información que de este se desprenda, aporte en estudios más amplios en donde si se realicen de forma más específica estudios sobre biología comparativa entre nematodos o aún más generales y complejos.

1.2 Phylum Nematoda

1.2.1 Aspectos generales

Con casi 26646 especies descritas y probablemente muchas sin describir, los nematodos representan uno de los grupos más abundantes de los Metazoa (1).

Teniendo en cuenta un enfoque basado en biología comparativa, debidamente expuesto en la sección anterior, presentamos a continuación las características generales que definen al Phylum Nematoda:

1. Son triploblásticos con simetría bilateral; son vermiformes no segmentados y su cavidad corporal más importante es considerado un pseudoceloma.
2. En corte transversal tienen un cuerpo redondo cubierto por una cutícula estratificada; su crecimiento se caracteriza por mudas de dicha cutícula.

3. Como característica exclusiva cuentan con órganos sensoriales denominados ánfidos en la región cefálica; algunas especies tienen órganos sensoriales caudales denominados fásmidos.
4. Cuentan con un aparato digestivo completo. Se observan distintos tipos de estructuras bucales siempre en arreglos con simetría radial. El ano puede o no ubicarse de manera terminal.
5. La mayoría presenta un sistema excretor único, compuesto por una o dos células en reneta o un set de túbulos colectores.
6. No tienen estructuras circulatorias o para intercambio de gases.
7. En su cuerpo solo hay musculatura longitudinal, no hay músculos en disposición circular.
8. Cuentan con una epidermis celular o sincicial, que forma cordones longitudinales donde se alojan los nervios.
9. Son dioicos. En muchos casos presentan un claro dimorfismo sexual. Los machos suelen tener una estructura de gancho en el extremo posterior.
10. Presentan un patrón de clivaje celular embrionario único, no radial o espiral. Esta característica es muy útil para realizar clasificaciones dentro del Phylum.
11. Habitan ambientes marinos, agua dulce, y ambientes terrestres; algunos son de vida libre y algunos otros parásitos.

1.2.2 Filogenia: lugar de los nematodos en el árbol de la vida

El Phylum Nematoda es parte de Ecdysozoa, un superphylum de animales definido en primera instancia por análisis de marcadores moleculares (2). La evidencia en base a análisis de caracteres morfológicos, que soporte a Ecdysozoa como un grupo distinto de otros taxones protostomados, es menos fuerte que los datos moleculares (3). Los phyla considerados dentro de Ecdysozoa están caracterizados por la presencia de una cutícula que es mudada periódicamente durante su ciclo de vida. Sin embargo, la naturaleza molecular de la cutícula y el mecanismo de ecdísis difiere entre los phyla. Otros caracteres compartidos atribuidos como evidencia de relación entre estos phyla incluyen la ausencia de cilios en los adultos, y en muchos miembros la presencia de una faringe trirradiada. El superphylum Ecdysozoa comprende dos grupos, los Panarthropoda que comprende los phyla Tardigrada, Onychophora y Arthropoda y los Cycloneuralia que comprende los phyla Nematoda, Nematomorpha, Priapulida, Kinorhyncha y Loricifera. Dentro de los Cycloneuralia, que podrían ser parafiléticos con respecto a los Panarthropoda, los clados Nematoda y Nematomorpha, aparecen consistentemente como grupos hermanos en análisis tanto morfológicos como moleculares (4) (5).

De acuerdo a la clasificación en base a caracteres morfológicos, el phylum Nematoda se organiza en dos clases, Adenophorea y Secernentea, y cada una de ellas esta subdivididas en dos y tres subclases, respectivamente. Cada una contiene varios órdenes y muchas familias como se describen a continuación (6).

La clase Adenophorea (afásmidos) cuentan con quimiorreceptores cefálicos llamados ánfidos, pero carecen de fásmidos caudales, tienen un sistema excretor relativamente simple, no cuticularizado, y sin túbulos colectores. La mayoría son de vida libre (marinos,

agua dulce, terrestres), sin embargo, hay especies parasitarias. Incluye las subclases Enoplia y Chromadoria. (e.g., *Dioctophyme*, *Trichinella*, *Trichuris*).

La clase Secernentea cuenta con ánfidos cefálicos y fásquidos caudales, tienen un sistema excretor relativamente complejo en algunos casos, con conductos cuticularizados y túbulos colectores bien desarrollados. La mayoría de las especies contenidas en este grupo son parásitas; aquellos de vida libre son predominantemente terrestres. Incluye las subclases Rhabditia, Spiruria, and Diplogasteria. (e.g., *Anchylostoma*, *Ascaris*, *Necator*, *Wuchereria*).

Por otro lado, utilizando la secuencia génica de la subunidad menor del ribosoma (SSU rRNA), los nematodos pueden dividirse en tres grandes grupos: Dorylaimia (Clado I), Enoplia (Clado II) y Chromadorea (el cual incluye Rhabditida, también como Secernentea). Rhabditida puede ser dividido en Sirurina (Clado III), Tylenchina (Clado IV) y Rhabditina (Clado V), Figura 1.1.

Cabe destacar que en este trabajo de tesis hemos tomado como base la última clasificación descrita de acuerdo a la secuencia SSU rRNA (7) y por ende consideramos la división en cinco Clados.

Como se ha mencionado anteriormente, los nematodos son muy diversos y ocupan literalmente, todos los tipos de ambientes sobre la tierra; esto va acompañado de una amplísima variedad de hábitos de vida e interrelación con otras especies. Uno de los hábitos de nematodos más estudiado es el parasitismo debido a los grandes daños que estos provocan en distintos tipos de organismos.

Actualmente, se postula que el parasitismo ejercido por nematodos tanto de animales como de plantas, ha aparecido múltiples veces durante la evolución del Phylum. Las primeras hipótesis, sin embargo, han sugerido que el ancestro común de los nematodos presentaba hábitos parasitarios para luego ir revirtiendo en los diferentes grupos observados. Estas hipótesis tenían sustento en la observación de que el grupo hermano de los nematodos (Phylum Nematomorpha) presenta todos sus miembros como parásitos dando la idea de un ancestro común con dichos hábitos. Notablemente, los orígenes independientes del parasitismo pueden ser validados mediante la ubicación filogenética utilizando datos moleculares de taxones parásitos junto con grupos de vida libre en grupos monofiléticos (8). De esta manera, utilizando datos moleculares se pueden definir al menos tres orígenes para el parasitismo de plantas, diez orígenes para el parasitismo de una amplia gama de animales no vertebrados y cinco para hospedadores animales a lo largo de los diferentes grupos dentro del Phylum (9).

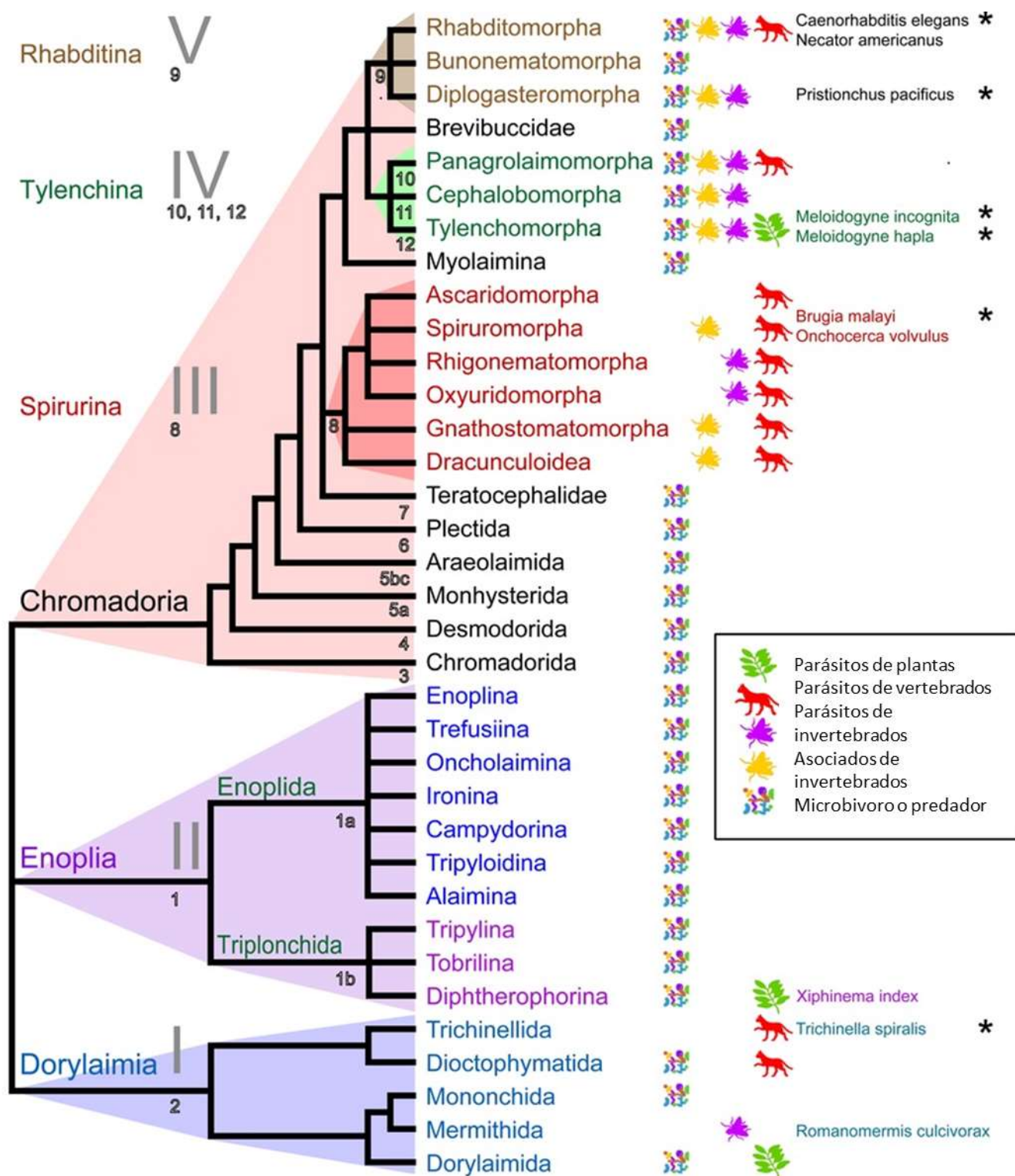


Figura 1.1: Filogenia de Nematodes. Esta filogenia se basa en análisis moleculares, que utilizan el gen del ARN ribosomal de subunidades pequeñas. Se dan los nombres sistemáticos dados por De Ley y Blaxter, al igual que la convención de nomenclatura de "clados" introducida por Blaxter et al. en 1998. Más recientemente, Helder y sus colegas han introducido un esquema de nombre de clado numérico: esto se da en letras delineadas debajo de las ramas relevantes. El modo de

alimentación y las asociaciones de vectores y parásitos de animales y plantas se indican mediante iconos pequeños, y las especies representativas se nombran para algunos grupos. Las especies con un genoma secuenciado se indican con un asterisco (10).

1.3 El nematode parásito

Diectophyme renale

Una vez ya adentrados en el campo de los nematodos nos centraremos en *Diectophyme renale*. Esta especie es comúnmente llamado gusano gigante del riñón y es el nematodo parásito más grande de vertebrados terrestres descrito hasta el momento. La especie presenta un dimorfismo sexual muy notorio siendo la hembra de considerable mayor tamaño con respecto al macho, el cual además posee una bursa copulatrix terminal en forma de copa que ayuda a su identificación.



Figura 2.1: Bursa copulatrix terminal en forma de copa de *D. renale* macho adulto. Fotografía tomada con una lupa Leica M60.

Los adultos se desarrollan y destruyen por completo los riñones de mamíferos que ocupan y, por lo tanto, es un parásito debilitante y potencialmente letal. Es altamente

patogénico y particularmente común en perros en Sudamérica (11,12) donde también afecta severamente a animales salvajes como el zorrillo vinagre (*Speothos venaticus*) (13) el perezoso de dos dedos del sur (*Choloepus didactylus*) (14), zorro devorador de cangrejo *Cerdocyon* (15) y el Aguará guazú (*Chrysocyon brachyurus*) (16,17,18,19). Este último es el cánido nativo más grande de América del Sur y está considerado como casi amenazado por la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza - Lista Roja 3.1), la dirofilosis se incluye entre las amenazas a su población silvestre (19,18).

El cambio climático, la degradación ambiental, la deforestación y el saneamiento comprometido alrededor de los asentamientos humanos, ha resultado en una fragmentación severa del hábitat en muchos puntos críticos de biodiversidad, y que ha obligado a los animales salvajes a migrar y enfrentarse a nuevas amenazas, entre las cuales se encuentran las mayores vulnerabilidades para contraer *D. renale*. Durante tales desplazamientos, las especies salvajes se superponen en la distribución con animales domésticos, y potencialmente exponen a los animales domésticos y humanos a fuentes de dirofilosis (20). Hay, por ejemplo, informes esporádicos de la infección en bovinos, equinos, porcinos y ratas (17,21,22) *Dirofilaria immitis* representa una zoonosis dado que se han registrado varios casos de infección en humanos, la mayoría procedente del sudeste asiático (23). Lamentablemente se desconoce la verdadera incidencia de la exposición, aunque ha sido una causa directa inequívoca de muertes, o asociada con carcinoma renal (24,23,25,26)

1.3.1 Ciclo biológico

Los adultos de *D. renale* (machos y hembras) se localizan en la pelvis renal (generalmente solo en el riñón derecho) de sus huéspedes definitivos, destruyendo el parénquima renal y dejando una cápsula delgada que encierra un nido de apareamiento de parásitos. El riñón no afectado por lo general se hipertrofia para compensar la pérdida completa de la función de su contraparte (27), de modo que puede no haber signos clínicos de infección durante algún tiempo. Los huevos se dispersan a través de la orina en el medio ambiente, donde son ingeridos por un anélido (generalmente un oligoqueto) en el que las larvas del parásito se desarrollan hasta la etapa L3(28)1. Si los anélidos infectados no son consumidos directamente por un huésped definitivo, las larvas pueden persistir en hospedadores paraténicos como ranas, peces y roedores, e incluso tortugas de agua dulce (29).

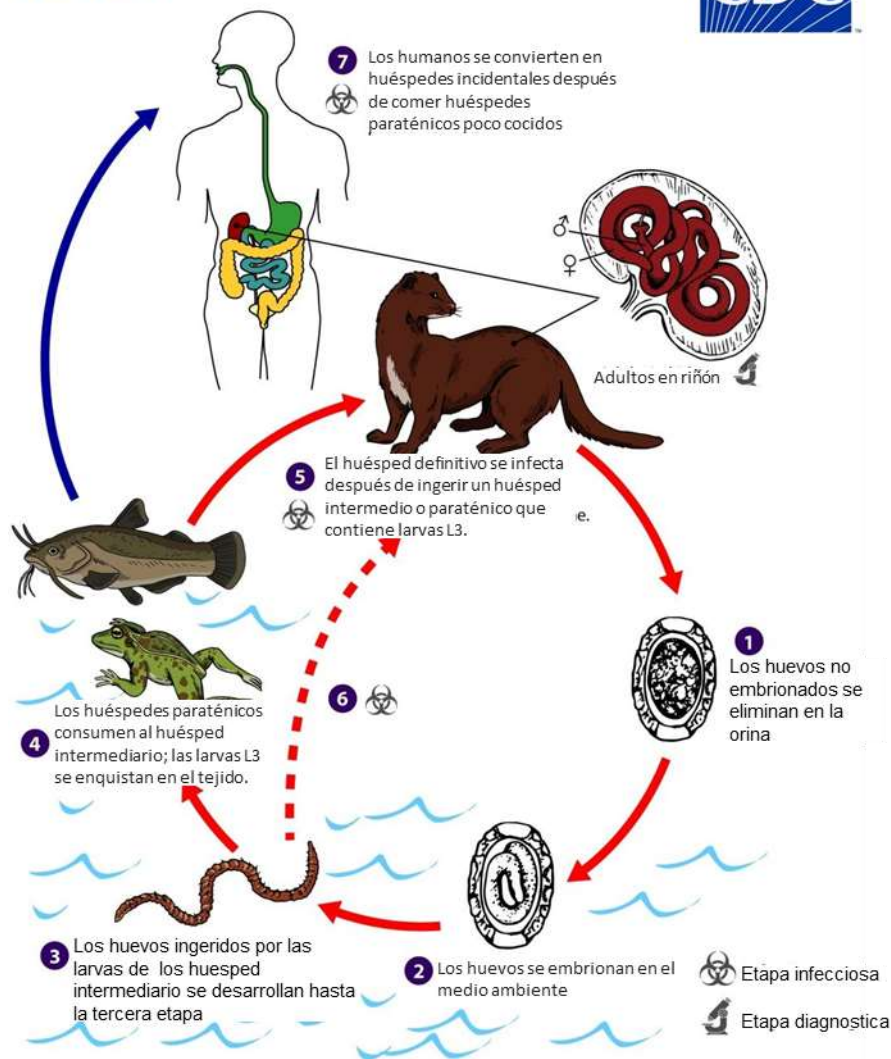


Figura 3.1: Ciclo biológico de *Diectophyme renale* en fauna silvestre. Figura tomada y adaptada de CDC (Centers for Disease Control and Prevention, 2019).

1.4 Dioctofimosis, situación actual

La Dioctofimosis es una enfermedad que se registra a nivel mundial, aunque es más común en perros que habitan América del Sur. Su diagnóstico se realiza mediante análisis de sedimento urinario, ecografías, cirugías o necropsias (30,31); siendo los dos últimos casos hallazgos de tipo fortuito. Aunque el parásito adulto generalmente se

encuentra en uno de los riñones, la infección puede ser bilateral y por consecuencia mortal, o desarrollarse ectópicamente en sitios como la cavidad abdominal, útero, ovario, glándula mamaria, uretra, los tejidos subcutáneos de la región inguinal y ganglios linfáticos mesentéricos (32).

Estudios recientes han implementado una técnica más sensible para detectar y contar los huevos de *Dioctophyme renale* en la orina (33). Sin embargo, este y otros métodos utilizados actualmente para el diagnóstico de dioctofimosis pueden no detectar infecciones prematuras, infértiles, de un solo sexo o ectópicas. Por otra parte, el equipo requerido dificulta la detección de la infección en áreas rurales y zonas perjudicadas económicamente. Trabajos recientes indican que antígenos solubles de esófago de *D. renale* podrían proporcionar la base de un método de serodiagnóstico para la dioctofimosis en perros (34). Aun así, se requiere con urgencia un método serodiagnóstico aplicable no solo en perros sino también a seres humanos, dado que las personas que viven bajo la línea de pobreza y malas condiciones sanitarias, pueden consumir huéspedes intermediarios e infectarse. El hecho de que existan personas sin recursos económicos suficientes o poca información sobre la existencia de esta enfermedad, también contribuye a la persistencia del parásito ya que alimentan a sus perros o gatos con carne cruda (de ranas o peces de agua dulce) en zonas con alta prevalencia del parásito, sobre todo por ser zonas inundables donde el ciclo del nematode se ve favorecido.

A pesar de la importancia y la amenaza que la Dioctofimosis representa para los humanos, los animales domésticos y los animales salvajes en peligro de extinción, existe una importante escasez de información molecular e inmunológica sobre este parásito.

1.5 Hipótesis y objetivos

Como especificamos anteriormente, a pesar del impacto que causa la Dioctofimosis (principalmente en caninos domésticos de nuestra región), hasta el momento la información disponible sobre este parásito abunda en descripciones morfológicas de distintos estadios y reportes de hallazgos de individuos de esta especie en animales domésticos, salvajes y en seres humanos. Por el contrario, no se reportan hasta la actualidad, trabajos que describan estudios bioquímicos ni genómicos de dicho nematodo. Tampoco existe gran desarrollo en materia de diagnóstico e intervenciones, incluyendo el control de hospedadores intermediarios y desarrollo de drogas y/o vacunas. En función de lo mencionado planteamos la siguiente hipótesis de trabajo:

El estudio bioquímico del nematode parásito *Dioctophyme renale*, desde un enfoque proteómico permitirá la identificación de marcadores moleculares específicos que podrán ser utilizados para el diagnóstico y control epidemiológico de esta infección. En dicho sentido, el objetivo general de este proyecto se focaliza, en el inicio de una caracterización molecular a nivel proteico del nematode parásito *Dioctophyme renale*, con la finalidad de aislar, identificar y caracterizar proteínas específicas.

Para poder alcanzar dicho objetivo utilizamos las siguientes estrategias:

Se abordó la búsqueda, identificación y caracterización de proteínas solubles presentes en líquido pseudocelómico (LPC) de *D. renale*. Estas proteínas suelen ser específicas y por ende altamente inmunogénicas en otros grupos de animales.

Por otro lado, también se realizó una búsqueda, eligiendo al LPC como tejido de estudio, de proteínas con alto potencial inmunogénico, que puedan ser útiles en el desarrollo de técnicas diagnósticas.

Finalmente, para poder ampliar los conocimientos bioquímicos en general de este nematode y en particular para identificar marcadores moleculares, se realizaron estudios proteómicos sobre los cuales se trabajó para lograr la identificación y caracterización de proteínas presentes en distintos tejidos. Además, se complementó con un estudio de la variabilidad genética que nos permita contextualizar poblacionalmente dicho nematode.

1.6 Bibliografía

1. Hugot JP, Baujard P, Morand S. Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: an overview. *Nematology*. 2001;3(3):199–208.
2. Aguinaldo AMA, Turbeville JM, Linford LS, Rivera MC, Garey JR, Raff RA, et al. Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature* [Internet]. 1997 May 29 [cited 2023 Feb 28];387(6632):489–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9168109/>
3. Taken a rather conservative approach, dividing them into Aplacophora and Testaria, the latter contrasting with most current phylogenetic evidence, either suggesting Serialia (. [cited 2023 Feb 28]; Available from: <https://academic.oup.com/icb/article/53/3/532/2363054>
4. Nakagawa TLDR, Bracarense APFRL, Reis ACF dos, Yamamura MH, Headley SA. Giant kidney worm (*Diectophyma renale*) infections in dogs from Northern Paraná, Brazil. *Vet Parasitol* [Internet]. 2007 Apr 30 [cited 2021 Mar 23];145(3–4):366–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17156927/>
5. Ryan JF, Pang K, Schnitzler CE, Nguyen AD, Moreland RT, Simmons DK, et al. The Genome of the Ctenophore *Mnemiopsis leidyi* and Its Implications for Cell Type Evolution. *Science* (1979). 2013 Dec 13;342(6164).
6. BRUSCA R. C., G. J. BRUSCA. *Invertebrates. segunda*. McGraw Hill, editor. Vol. 2. Madrid; 2005.

7. de Ley P, Blaxter M. Systematic Position and Phylogeny. In: The Biology of Nematodes. CRC Press; 2002. p. 1–30.
8. Dorris M, de Ley P, Blaxter ML. Molecular Analysis of Nematode Diversity and the Evolution of Parasitism. *Parasitology Today*. 1999 May;15(5):188–93.
9. BLAXTER M, KOUTSOVOULOS G. The evolution of parasitism in Nematoda. *Parasitology*. 2015 Feb 25;142(S1):S26–39.
10. Blaxter M. Nematodes: The Worm and Its Relatives. *PLoS Biol*. 2011 Apr 19;9(4):e1001050.
11. Ribeiro Amato JF, Grisi L, Miranda Da Rosa VL. Reunião dos casos brasileiros de *Diectophyma* canina, com o registro do caso de mais alta intensidade de infecção por *Diectophyma renale* (Goeze, 1782). *Rev Bras Biol*. 1976 Jun;36(1):117–22.
12. de Freitas Tancredi MG, Tancredi IP, de Oliveira LJ, de Oliveira AL, Braga ÍA, Saturnino KC, et al. Occurrence of ectopic *Diectophyma renale* in a Bolivian dog. *Vet Parasitol Reg Stud Reports*. 2021 Jul;25:100604.
13. Mesquita LR, Rahal SC, Faria LG, Takahira RK, Rocha NS, Mamprim MJ, et al. Pre- and post-operative evaluations of eight dogs following right nephrectomy due to *Diectophyma renale*. *Veterinary Quarterly* [Internet]. 2014 Jul 3 [cited 2021 Mar 23];34(3):167–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24832362/>
14. Ferreira VL, Medeiros FP, July JR, Raso TF. *Diectophyma renale* in a dog: Clinical diagnosis and surgical treatment. *Vet Parasitol* [Internet]. 2010 Feb 2 [cited 2023 Mar 5];168(1):151. Available from: [/pmc/articles/PMC7116962/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/201116962/)
15. Kommers GD, Ilha MR da S, Barros CSL de. *Diectofimose* em cães: 16 casos. *Ciência Rural* [Internet]. 1999 Sep [cited 2020 May 14];29(3):517–22. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84781999000300023&lng=en&nrm=iso&tlng=pt
16. Rocha UF, Serra RG GR. Parasitismo por *Diectophyma renale* (Goeze, 1782) em “preguiça” *Choloepus didactylus*, Linnaeus, 1758. *Rev Farm Bioquim Univ*. 1965;(3):325–34.
17. Ribeiro CT, Verocal GG, Tavares LER. *Diectophyme renale* (Nematoda, *Diectophymatidae*) infection in the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) from Brazil. *J Wildl Dis*. 2009;45(1):248–50.
18. Duarte J, Miranda Bezerra Costa A, Katagiri S, Amancio Martins J, Elena Oliveira M, Mello Ribeiro C. PARASITISMO POR *Diectophyme renale* (GOEZE, 1782) EM LOBO-GUARÁ (*Chrysocyon brachyurus*), BRASIL. *Vet Zoot*. 2013.
19. Mattos Varzone JR, Cury Thomaz de Aquino LP, Rodovalho MV de T. Macroscopic findings of lesions resulting from parasitism by *Diectophyma renale* in Lobo-Guará (*Chrysocyon brachyurus*) - case report. *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde* [Internet]. 2008;XII(2):171–8. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=26012841015>
20. Maia OB, Gouveia AMG. Birth and mortality of maned wolves *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1811) in captivity. *Braz J Biol* [Internet]. 2002 [cited 2023 Mar 2];62(1):25–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12185920/>

21. Deem SL, Emmons LH. Exposure of free-ranging maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) to infectious and parasitic disease agents in the Noël Kempff Mercado National Park, Bolivia. *J Zoo Wildl Med* [Internet]. 2005 [cited 2023 Mar 2];36(2):192–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17323558/>
22. Myers N, Mittermeyer RA, Mittermeyer CG, da Fonseca GAB, Kent J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 2000 403:6772 [Internet]. 2000 Feb 24 [cited 2023 Mar 2];403(6772):853–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/35002501>
23. Beaver PC, Theis JH. Diocytophymatid larval nematode in a subcutaneous nodule from man in California. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1979 [cited 2023 Mar 2];28(2):206–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/156507/>
24. Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, Jennings 2nd FW. *Veterinary Parasitology* (Veterinary Series). United Kingdom. 1996;307.
25. Venkatrajaiah N, Kalbande SH, Rao GVN, Reddy VC, Reddy SH, Rao PR, et al. Dioctophymatosis renalis in humans: first case report from India. *J Assoc Physicians India*. 2014 Oct;62(10):70–3.
26. Li G, Liu C, Li F, Zhou M, Liu X, Niu Y. Fatal bilateral dioctophymatosis. *J Parasitol* [Internet]. 2010 Dec [cited 2023 Mar 2];96(6):1152–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21158627/>
27. Katafigiotis I, Fragkiadis E, Pournaras C, Nonni A, Stravodimos KG. A rare case of a 39 year old male with a parasite called Dioctophyma renale mimicking renal cancer at the computed tomography of the right kidney. A case report. *Parasitol Int* [Internet]. 2013 Oct [cited 2023 Mar 2];62(5):459–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23811203/>
28. Kuehn J, Lombardo L, Janda WM, Hollowell CMP. Giant kidney worms in a patient with renal cell carcinoma. *BMJ Case Rep* [Internet]. 2016 Mar 7 [cited 2023 Mar 2];2016. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26952087/>
29. Duarte J, Costa AMB, Katagiri S, Martins JA, Oliveira ME, Ribeiro CM. Parasitism by Dioctophyme renale (Goeze, 1782) in maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*), Brazil. *Veterinária e Zootecnia* [Internet]. 2013 [cited 2021 Mar 23];20(1):52–6. Available from: <https://xdocs.com.br/doc/parasitism-by-dioctophyme-renale-goeze-1782-in-maned-wolf-chrysocyon-brachyurus-brazil-d8m31zv62pop>
30. Pedrassani D, Hoppe EGL, Avancini N, Nascimento AA do. Morphology of eggs of Dioctophyme renale Goeze, 1782 (Nematoda: Dioctophymatidae) and influences of temperature on development of first-stage larvae in the eggs. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* [Internet]. 2009 [cited 2023 Mar 2];18(01):15–9. Available from: <http://www.scielo.br/j/rbpv/a/yWWPNPXn6BGrgWFrMBCS9K/?lang=en>
31. Mascarenhas CS, Müller G. Third-stage larvae of the enoplid nematode Dioctophyme renale (Goeze, 1782) in the freshwater turtle Trachemys dorbigni from southern Brazil. *J Helminthol* [Internet]. 2015 Sep 7 [cited 2023 Mar 5];89(5):630–5. Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-helminthology/article/abs/thirdstage-larvae-of-the-enoplid-nematode-dioctophyme-renale-goeze-1782-in-the-freshwater-turtle-trachemys-dorbigni-from-southern-brazil/DB1A4B0A9AE404357AED323CECB5A1BB>

32. Pereira- Figueiredo MA, Franco-da Silva D, Gómez- Manrique W, Rodrigues- de Sousa AA. Ciclo errático de *Dioctophyme renale*: relato de dois casos. *Orinoquia*. 2013 Jan 1;17(1):96.
33. Georgi JR, Georgi ME. *Canine clinical parasitology*. Canine clinical parasitology. 1991.
34. Lima VFS, Ramos RAN, Lepold R, Cringoli G, Rinaldi L, Faustino MA da G, et al. Use of the FLOTAC technique to diagnosing parasites of the urinary tract of dogs. *Parasitol Res* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2023 Mar 5];115(4):1737–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26864789/>
35. Pedrassani D, Nascimento AA do, André MR, Machado RZ. Improvement of an enzyme immunosorbent assay for detecting antibodies against *Dioctophyma renale*. *Vet Parasitol* [Internet]. 2015 Sep 15 [cited 2023 Mar 5];212(3–4):435–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26299933/>

Caracterización de proteínas del líquido pseudocelómico

2.1 Introducción al capítulo

2.2 Análisis de las proteínas presentes en el líquido pseudocelómico (LPC)

2.3 Purificación de proteínas mayoritarias presentes en LPC de *D. renale*

2.4 Búsqueda de la identidad de las proteínas P44 y P17

2.5 Estudio del poder inmunogénico de las proteínas P44 y P17

2.6 Discusión

2.1 Introducción al capítulo

2.1.1 Material parasitario

Las muestras biológicas utilizadas en este trabajo de tesis son provenientes de áreas circundantes a la ciudad de La Plata, Argentina, Figuras 1.2 y 2.2. Estas áreas son ribereñas y son endémicas para este nematode ya que presenta varias de las problemáticas sociales planteadas anteriormente lo que favorece la elevada prevalencia en dicha región (35) En particular, los ejemplares adultos del parásito fueron obtenidos a partir de cirugías realizadas a caninos, previamente diagnosticados con diotrofimosis mediante ecografía y/o análisis del sedimento urinario. Dichas intervenciones, se realizaron en el marco del Proyecto de Voluntariado Universitario: Zoonosis parasitarias en el barrio El Molino. El mismo es un trabajo barrial integrado bajo el concepto "un mundo una salud" que se lleva a cabo en el "Barrio El Molino" de la Localidad de Ensenada y cuya directora es la Profesora Titular de la Cátedra de Parasitología Comparada Nilda Ester Radman, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. El grupo de trabajo dirigido por la Prof. Radman realiza tareas en el lugar desde el año 2005. Así, se generó el CCEU (centro comunitario de extensión universitaria) No 8 "El Molino" y la mesa barrial, interactuando sobre las diferentes problemáticas territoriales con los referentes del barrio y representantes de las diferentes Instituciones y proyectos UNLP. Durante las jornadas sanitarias se aporta al diagnóstico y tratamiento de diferentes infecciones parasitarias en los animales y las personas, especialmente aquellas de tipo zoonótico, también se realizan esterilizaciones y nefrectomías en el barrio, con un quirófano instalado en la Capilla del lugar. También se dictan talleres de salud en todos

los niveles educativos remarcando las conductas de riesgo a modificar y las medidas preventivas a tomar.



Figura 1.2: Zona ribereña del Río de La Plata de donde se tomaron muestras. Se pueden ver las localidades de La Plata, Berisso y Ensenada. Fotos tomadas de google maps (<https://www.google.com/maps/place/Unidad+Sanitaria+El+Molino/@-34.8375007,-57.9485704,15z/>).



Figura 2.2: Zona ribereña del Río de La Plata, ciudad de Ensenada. En esta fotografía podemos observar las viviendas cercanas a los cuerpos de agua.

Dado el gran tamaño que presentan estos nematodos parásitos, es posible realizar técnicas de disección de tejidos con una alta precisión. Además, se puede obtener el LPC en gran cantidad por punción como se muestra en la Figura 3.2. La cantidad de LPC

obtenida es considerablemente mayor en comparación a la que se puede obtener del resto de los nematodos parásitos, llegando a ser aproximadamente 5 ml por ejemplar hembra (ver Apéndice 1).

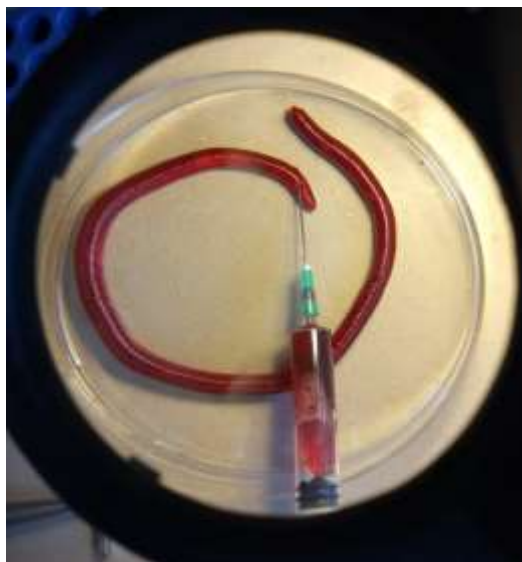


Figura 3.2: Obtención de LPC de *D. renale* a partir de una hembra adulta, mediante punción a nivel de la transición entre esófago y el resto del tubo digestivo.

2.2 Análisis de las proteínas presentes en el líquido pseudocelómico

Como primer paso, luego de la disección de tejidos y obtención del LPC mediante punción (ver técnicas en Apéndice 1), las proteínas del LPC y las proteínas solubles de distintos tejidos (pared corporal, intestino, testículos y ovario) se separaron mediante SDS- PAGE (Figura 4.2). El perfil proteico que se observó en las muestras de LPC presentó dos proteínas notablemente abundantes, una de peso molecular aproximado a 17 kDa (designada P17) y otra de peso molecular aproximado a 44 kDa (designada P44) tanto en machos como en hembras. Como primera noción de la diferente composición

proteica entre los tejidos podemos observar que las proteínas de la pared corporal, el intestino, los testículos y el ovario mostraron poca superposición entre sí, excepto por la presencia común de una proteína de peso molecular similar a P44 (Figura 4.2). Es importante destacar que el perfil proteico del LPC de *D. renale* es diferente del perfil observado en LPC de adultos de ascarididos como *Ascaris suum* y *Toxocara canis*, otros nematodos parásitos lo suficientemente grandes para que el LPC pueda recuperarse fácilmente (36,37). Las proteínas más abundantes encontradas en LPC de ascarididos adultos, son monómeros de aproximadamente 14,4 kDa llamados poliproteínas alérgicas de nematodos (NPAs) (38,39,40) y una globina de aproximadamente 43 kDa (41,42).

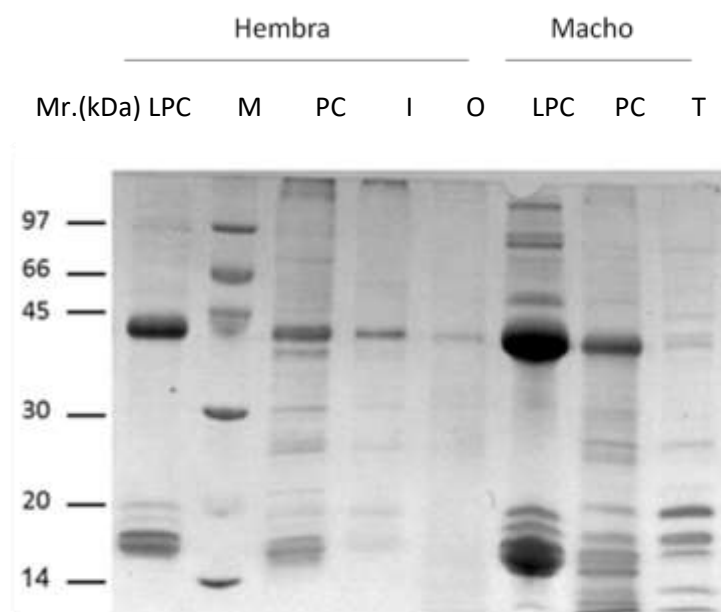


Figura 4.2: en esta figura se pueden observar los perfiles proteicos de tejidos y líquido pseudocoelómico (LPC) de adultos *D. renale*. SDS-PAGE de extractos de proteínas solubles del LPC y tejidos de gusanos adultos hembras y machos adultos se ejecutan en condiciones reductoras y se tiñen con azul de Coomassie. Calle LPC: líquido pseudocelómico; Calle PC: pared corporal; Calle I: intestino; Calle O: ovario; Calle T: testículo; Calle M: Marcador de peso molecular en kiloDaltons (kDa). Otro análisis en gel mostró que el perfil de proteínas del intestino de machos y hembras era similar (no se muestra). Abreviatura: _{MR}, movilidad relativa.

2.3 Purificación de proteínas mayoritarias presentes en LPC de *D. renale*

2.3.1 Análisis biofísico de las proteínas mayoritarias del líquido pseudocelómico (P44 y P17)

Con el objetivo de purificar y caracterizar las proteínas mayoritarias observadas anteriormente, se sembraron alícuotas de LPC de *D. renale* en una columna de exclusión molecular Superdex 75 (ver Apéndice 2). De esta manera se fraccionaron por tamaño los distintos componentes proteicos del fluido corporal (Figura 5 A.2).

Las dos proteínas principales fueron aisladas exitosamente, como se observa en el SDS-PAGE de las fracciones obtenidas (Figura 5B.2). Los tamaños de estas proteínas calculados en relación con el tiempo de elución de las proteínas de calibración estándar se aproximaron a los valores obtenidos por SDS-PAGE en condiciones reductoras (Figura 5B.2), lo que indica que ambas proteínas eluyeron de la columna como monómeros y, por lo tanto, pueden existir como tales en el LPC.

Los pesos moleculares exactos fueron determinados independientemente, utilizando el servicio de espectrometría de masas LANAIS PRO EM Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA, dando como resultado 44.460 Da para P44 y 16.622 Da para P17.

Un aspecto llamativo luego de la purificación mediante cromatografía de exclusión molecular fue que la proteína P17 es intensamente roja y también retiene su color en

geles de poliacrilamida nativos, pero no cuando la misma es corrida en un SDS-PAGE. Estos resultados indicarían que el cromóforo rojo probablemente está unido de forma no covalente, al igual que el grupo prostético hemo en proteínas como sucede con las globinas de vertebrados (hemoglobina P68871(UniProt), mioglobina P02144 (UniProt), neuroglobina Q9NPG2 (UniProt)). La masa molecular de P17 es similar a la de las 'nemglobinas' que se han descrito a partir de nematodos (43), pero que no están relacionadas con las globinas de vertebrados. Los nematodos a partir de los cuales se han descrito las nemglobinas están en otros clados (Clados II a V) que están filogenéticamente remotos del Clado I en el que *D. renale* ahora está ubicado (44,45), por lo que la relación evolutiva de P17, si la hay, con las nemglobinas sigue sin ser establecida.

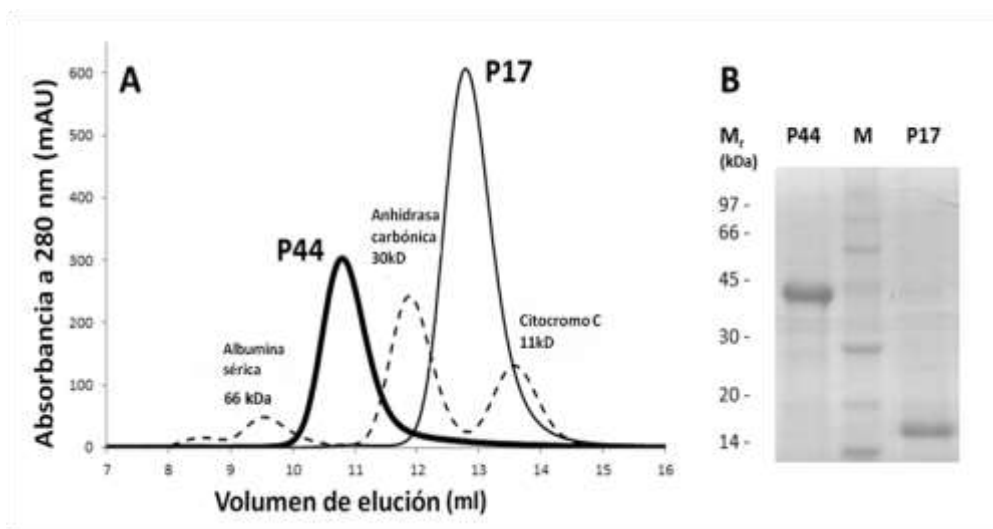


Figura 5.2. A: Purificación de las proteínas P17 y P44 las más abundantes del LPC de *D. renale* adulto. Los perfiles de elución de con líneas continuas corresponden a las proteínas P17 y P44, cuyo análisis por espectrometría de masas produjo valores de 16.622 Da y 44.460 Da, respectivamente. Los perfiles de elución de las tres proteínas estándar están superpuestos (líneas discontinuas). B: Análisis SDS-PAGE de las diferentes fracciones después de la exclusión molecular, teñido Coomassie blue. Carril M: proteínas de referencia con masas mostradas en kilo Daltons (kDa). Abreviatura: M_R , movilidad relativa.

2.3.2 Espectros de dicroísmo circular.

Con el objetivo de obtener información sobre el contenido global de estructura secundaria y terciaria de estas proteínas mayoritarias, colectamos espectros de dicroísmo circular en la región lejana (200-250 nm) y cercana (250-320 nm) del espectro UV, respectivamente (ver Apéndice 2). Como se observa en la Figura 6.2 (línea naranja), P17 presenta un espectro en la región del UV lejano típico de una proteína con alto contenido de alfa-hélices. Puntualmente, presenta dos mínimos situados a 222 y 210 nm y un máximo por debajo de 200 nm. Este resultado está de acuerdo con lo observado típicamente para proteínas del tipo globinas como se ejemplifica en la Figura 7B.2.

Por el contrario, P44 presenta un espectro más complejo (Figura 6.2, línea azul). El mismo presenta una forma que parecería representar a una proteína con estructura desordenada como se ejemplifica en la Figura 7A.2, dado que presenta valores francamente negativos para bajas longitudes de onda. Este tipo de espectro dificulta mucho realizar una estimación del tipo de estructura secundaria que presenta. Llamativamente, cuando se obtuvo el espectro en el UV cercano (Figura 8.2, línea azul) se observó presencia de una estructura fina del mismo, coincidente con una población de proteínas en una conformación estable. Este resultado daría evidencia que P44 se encuentra plegada correctamente. Cabe destacar, que, si estuviera desordenada, se observaría un espectro chato y sin ningún tipo de forma. Finalmente, el espectro en el UV cercano para P17 también fue coincidente con una conformación proteica estable.

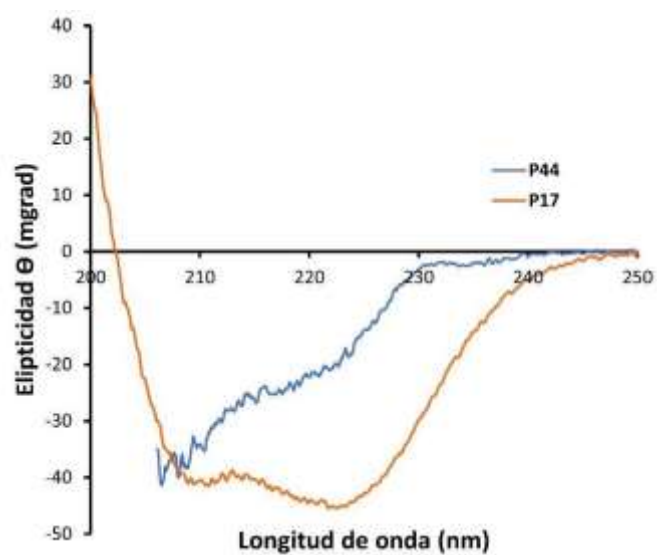
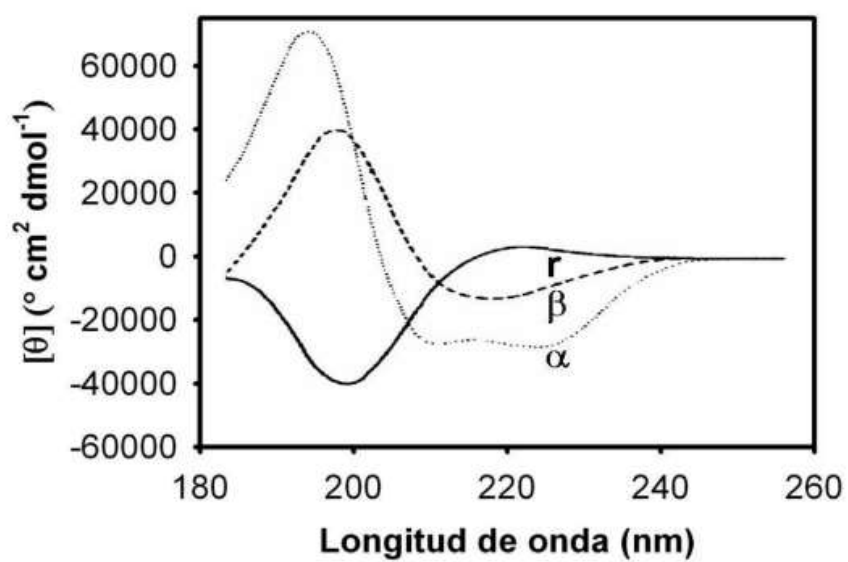


Figura 6.2: Espectros de dicroísmo circular en el UV-lejano (200-250 nm) de P17 y P44.

A



B

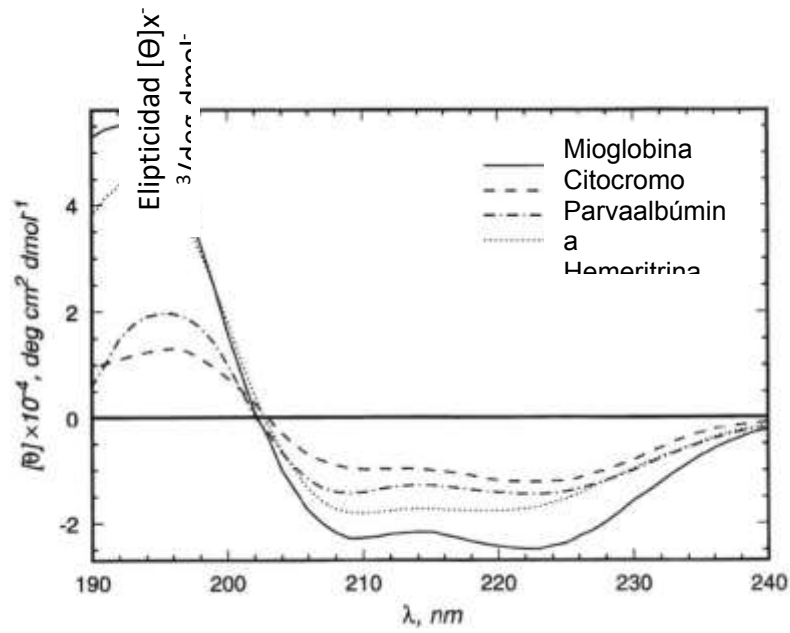


Figura 7.2. A: Espectros típicos para las estructuras secundarias alfa y beta. También se muestra una cadena desordenada (r). Adaptada de Brahms & Brahms, 1980 (46) B: representación de los espectros de CD de proteínas alfa-hélices (47).

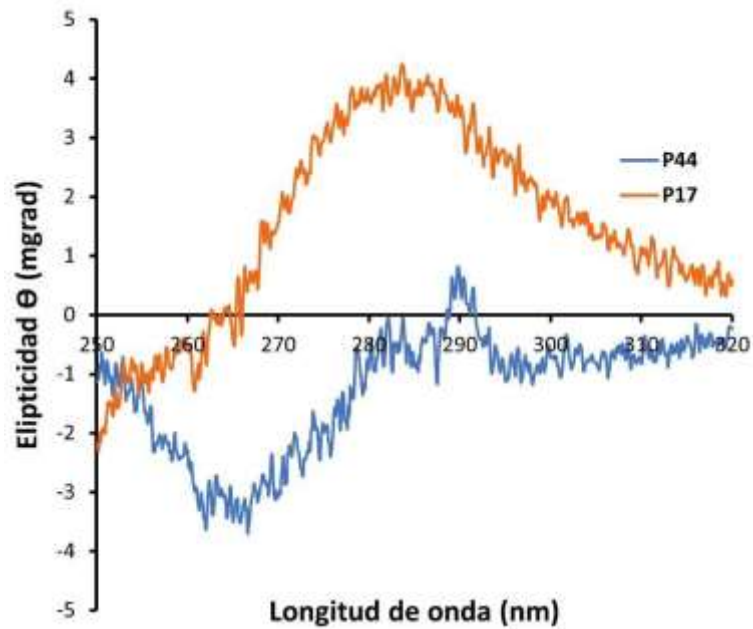


Figura 8.2: Espectros de dicroismo circular en el UV-cercano (250-320 nm) de P17 y P44.

2.3.3 Estudios de lípidos asociados a proteínas del LPC de *D. renale*

Las proteínas más abundantes que se encuentran en la sangre de animales vertebrados o la hemolinfa de insectos son a menudo proteínas respiratorias o transportadoras de lípidos, en base a estas observaciones se comenzó con la caracterización de P44 y P17 comprobando si alguna de estas presentaba unión a lípidos. Para determinar las clases de lípidos presentes en LPC en general y asociadas con P17 o P44 en particular, se realizaron extracciones de lípidos por la técnica de Folch y los mismos se analizaron por TLC (cromatografía en capa fina) (ver Apéndice 2). Como se ve en la Figura 9.2, los lípidos encontrados en LPC no fraccionado fueron heterogéneos y similares en tipo y concentraciones relativas a los presentes en hígado de rata. En contraste, los lípidos encontrados en asociación con P44 (y en mucho menor medida con P17) fueron ácidos grasos.

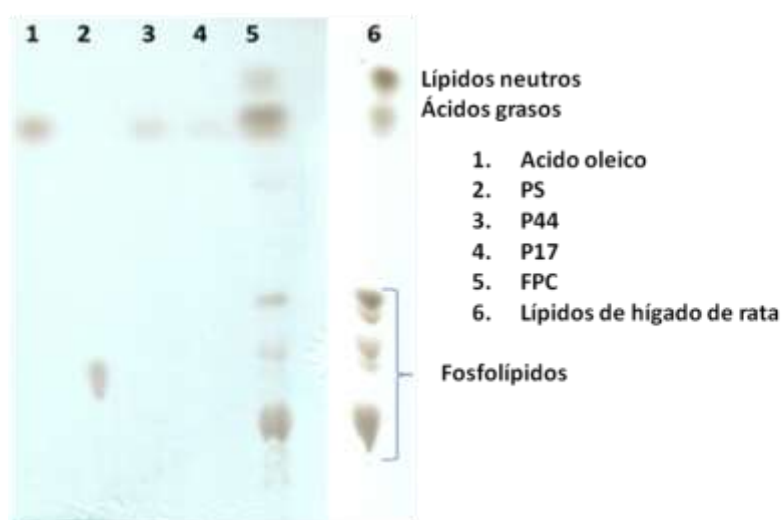


Figura 9.2: Lípidos asociados con las proteínas P17 y P44 del líquido pseudocoelómico de *D. renale*. Los lípidos se extrajeron de P44 y P17 purificadas y de LPC no fraccionado como se describe en el apéndice, y se separaron por TLC para resolver los lípidos polares. Se incluyeron lípidos de hígado de rata para comparación. LPC contiene lípidos similares al hígado de rata, pero P44 parece asociarse selectivamente con ácidos grasos mientras que P17 muestra una asociación de trazas con ácidos grasos.

Como ensayo adicional, se incubó LPC con DAUDA (un ácido graso de 11 carbonos marcado en su extremo omega (metilo) con el fluoróforo dansilo sensible al ambiente) para luego correr las muestras en un gel de poliacrilamida en condiciones nativas (Figura 10.2). Como se observa en la Figura 10.2, una proteína que migra a la misma posición que P44 une la sonda. Es importante destacar que se incluyó como control positivo una proteína que une lípidos ABA-1A que está muy bien caracterizada en nuestro grupo de trabajo (48). Para el caso de P17 no se observó ninguna emisión de fluorescencia (compárese con la Figura 11A y B.2).

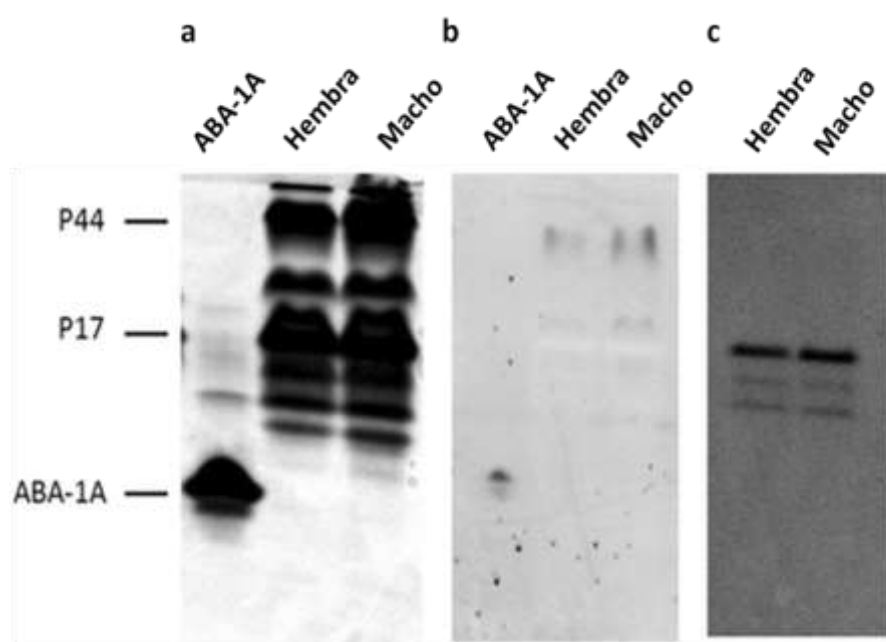


Figura 10.2: Unión de lípidos por proteínas del fluido pseudocoelómico de *D. renale* visualizado en una electroforesis en gel de poliacrilamida nativa de LPC de gusano adulto con ABA-1A recombinante de *Ascaris suum* como control. Gel teñido con Coomassie blue. b Lo mismo que (a). Gel en el que se preincubaron muestras de proteínas con el análogo fluorescente de ácido graso DAUDA, sensible al medio ambiente antes de la electroforesis, visto bajo luz ultravioleta. Se muestra la imagen de la emisión de fluorescencia de DAUDA. Las proteínas que

migran en proporción con P44 y ABA-1A en tamaño se asocian con DAUDA indicativo de actividad de unión a lípidos. c Gel similar, visto bajo luz visible, en el cual solo es visible el rojo intenso de P17. P17 pierde su color bajo SDS-PAGE (no se muestra), lo que indica que el cromóforo rojo no está unido covalentemente. La comparación con (b) muestra que P44, pero no P17, se une a DAUDA, que también fue el caso en espectrofluorimetría (ver texto principal). La Figura 10 c.2 muestra una corrida similar no desnaturizante del LPC sin tinción, que se fotografió con luz visible. P17 retuvo su color rojo en estas condiciones; una banda roja fuerte apareció a la altura de la movilidad relativa aproximada para P17, pero también dos bandas claras de movilidad relativa más bajas que podrían indicar otras isoformas o variantes de la proteína.

2.3.4 Análisis espectrofluorométrico de la unión de lípidos por P44

El LPC de otros nematodos grandes, como los ascarididos adultos, tiene altas concentraciones de proteínas de unión a lípidos, particularmente las NPA mencionadas anteriormente. Las mismas han sido extensivamente caracterizadas estructural y funcionalmente (38,39,40). Dado que vimos que P44 une ácidos grasos (Figura 10.2), caracterizamos además las propiedades de unión a ligando de la proteína usando sondas fluorescentes sensibles al ambiente. Para esto deslipidizamos completamente P44 utilizando HPLC de fase inversa (ver Apéndice 2) (49).

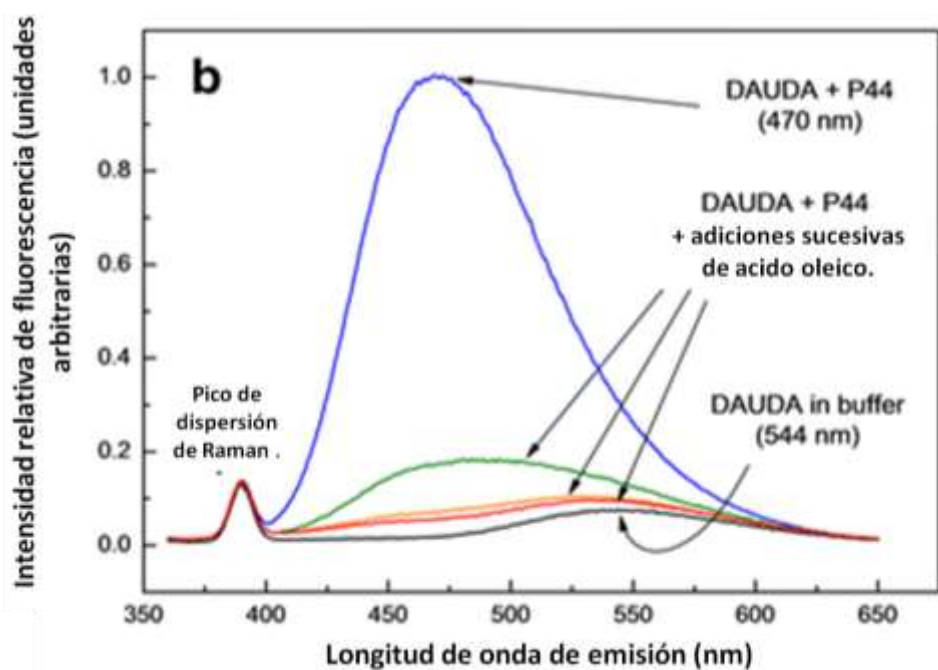
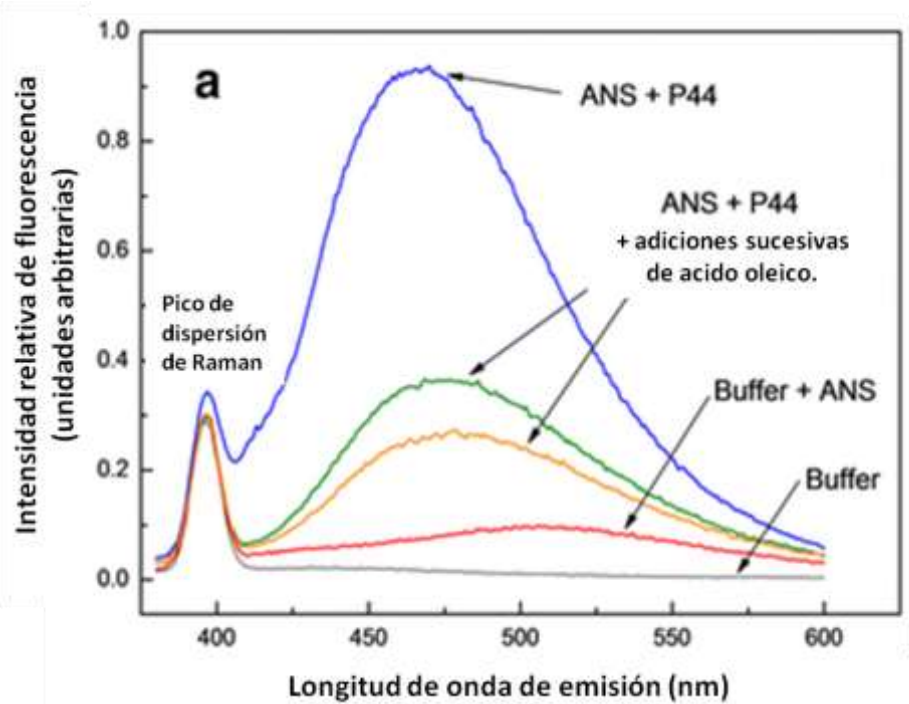
- Ensayos de unión a ácido 8-anilinaftaleno-1-sulfónico (ANS)

El ANS es una sonda fluorescente no específica, ya que se une a sitios y bolsillos hidrofóbicos presentes en proteínas. Dicha sonda fue utilizada para detectar intermediarios de plegamiento y caracterizar el denominado estado de “glóbulo fundido” en distintas proteínas (50). El agregado de P44 a una solución de ANS determinó un considerable aumento en la emisión de fluorescencia, así como también un corrimiento en la posición del máximo (Figura 11a.2). Dichos cambios en características espectroscópicas del ANS denotan la unión a entornos hidrofóbicos. La

adición de ácido oleico a los complejos preformados P44: ANS resultó en el desplazamiento de ANS de la proteína, lo cual da evidencia de un sitio compartido por ambos ligandos.

-Ensayos de unión a ácido 11-(dansilamino)undecanoico (DAUDA)

El análogo de ácido graso fluorescente DAUDA al igual que el ANS, es un fluoróforo sensible al ambiente que exhibe baja fluorescencia en entornos acuosos. Dicha emisión aumenta notablemente su intensidad y la posición del máximo se corre hacia el azul cuando se encuentra en un entorno apolar, como un sitio de unión presente en proteínas (50). Esta sonda es un análogo de ácidos grasos, y por lo tanto se une solo a algunas de las proteínas que unen ácidos grasos especializadas de los mamíferos, y también se une a las NPA y otras proteínas de unión a lípidos que se encuentran sólo en nematodos (FAR y nem FABPs (51,52)). La emisión de fluorescencia de DAUDA aumentó considerablemente cuando se mezcló con P44 deslipidizada, y la longitud de onda para el máximo de emisión experimentó un corrimiento hacia el azul desde 544 nm a 470 nm (Figura 11 b.2). Estos cambios espectrales son similares a los observados con ABA- 1A utilizada como control (no se muestra) (51). Los corrimientos en la posición del máximo de emisión hacia el azul de esta magnitud rara vez se observan para la sonda DAUDA, por ejemplo, con proteínas de unión a ácidos grasos citosólicos (51,52) o albúminas del suero de vertebrados (50), y es indicativo de un entorno altamente apolar. Cuando se añadió ácido oleico a los complejos DAUDA: P44 preformados, hubo un claro desplazamiento de la sonda, lo que indica que el sitio de unión sería preferencial para los ácidos grasos y que el grupo dansilo unido es probablemente irrelevante para la unión.



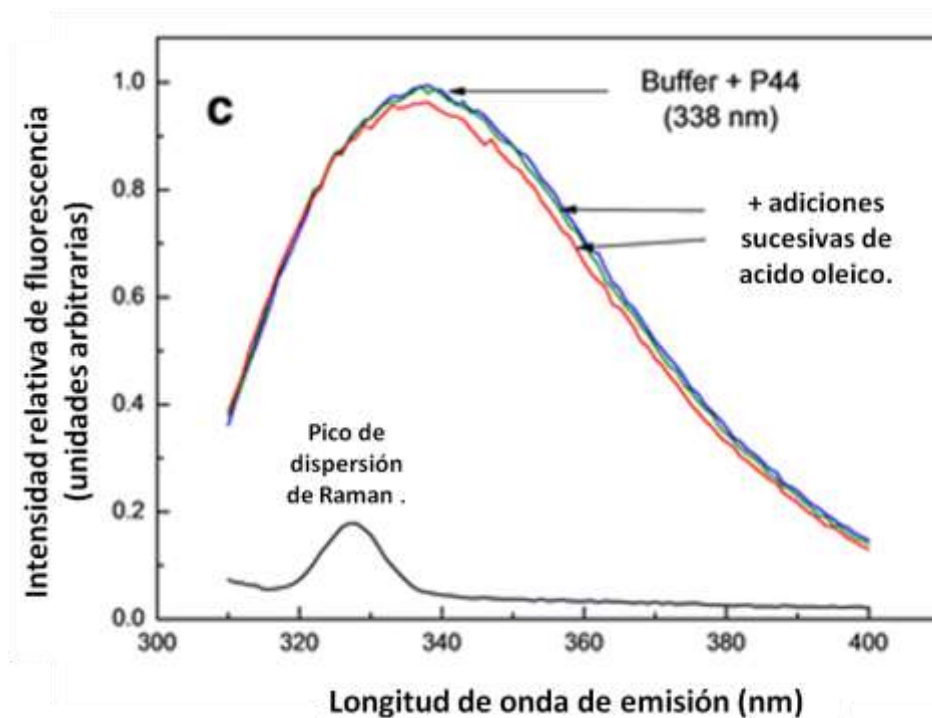


Figura 11.2 a: Unión del ligando hidrofóbico por P44 de *D. renale*. Se añadió P44 purificada y deslipidizada Superdex 75 (1,3 μM) a la sonda hidrofóbica no específica ANS (3,3 μM) en PBS, causando un aumento dramático en la emisión de fluorescencia de la sonda. Las adiciones sucesivas de 0,5 μl de ácido oleico 1 mM revirtieron parcialmente el aumento de la fluorescencia. Longitud de onda de excitación = 350 nm.

b P44 (1.3 μM) agregada al DAUDA, análogo de ácido graso marcado con fluoróforo dansilo (0.3 μM) en buffer, produjo un aumento dramático en la intensidad de fluorescencia y un cambio hacia el azul en la posición del máximo de emisión de DAUDA de 544 nm a 470 nm. Esto se revirtió con adiciones sucesivas de 0,5 μl de ácido oleico 1 mM. Experimentos similares con P17 de *D. renale* revelaron que no hay unión de DAUDA (no se muestra). Longitud de onda de excitación = 345 nm.

c Emisión de fluorescencia intrínseca (predominantemente triptófanos) de P44. P44 en buffer se excitó a 295 nm produciendo un pico de emisión de fluorescencia a 338 nm. Las adiciones sucesivas de 0,5 μl de solución de ácido oleico 1 mM en etanol a 300 μl de proteína en PBS produjeron cambios muy leves, si hubo cambios en la intensidad de emisión y la longitud de onda de la emisión máxima. El espectro del tampón solo se resta de cada uno de los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca P44.

-Ensayos de unión a ligandos mediante fluorescencia intrínseca

En algunas proteínas que unen lípidos, la unión de un ligando altera el entorno de una cadena lateral de triptófano (Trp) que es detectable por un cambio en la intensidad y /

o longitud de onda de emisión de fluorescencia (53). La excitación de una muestra de la proteína deslipidizada a 295 nm (en la que la emisión de fluorescencia por triptófano domina sobre la de fenilalanina y tirosina) provocó un espectro de emisión que se muestra en la Figura 11c.2. Con la dispersión Raman del buffer sustraído, la longitud de onda a la cual se observó el máximo de emisión de fluorescencia por P44 ocurrió a 338 nm. La emisión de fluorescencia de Trps es sensible a la polaridad del ambiente de su cadena lateral de indol, de modo que la exposición total al agua producirá un máximo de emisión a aproximadamente 356 nm, el cual se desplazará hacia el azul en las proteínas en las que dicho Trp está formando parte del core (48,54,55). En el caso de P44, la longitud de onda de emisión máxima es de 338 nm (Figura 11c.2), lo que representa un desplazamiento hacia el azul de aproximadamente 18 nm respecto a la de un Trp que está completamente expuesto al solvente (por ejemplo, ABA-1A) (54,56). Si bien al momento de realizar los experimentos no se conocían el número exacto de Trps en P44, la información que luego brindó el genoma reveló que presenta siete Trps en promedio. Entonces, el espectro de emisión será un compuesto de emisiones de varios Trps que pueden tener diferentes entornos. Si el entorno de una cadena lateral de Trp formando parte de una proteína se ve afectado por la unión de un ligando lipídico, entonces el espectro de emisión puede cambiar ya sea con un corrimiento más pronunciado hacia el azul o aumentando en intensidad (53). Sin embargo, con P44, la adición de ácido oleico a la proteína deslipidizada no causó un cambio en la intensidad de emisión de fluorescencia o la posición del máximo de emisión, por lo que puede ser que ninguno de los Trps de la proteína esté cerca de, o en el sitio de unión al ligando. Otra posibilidad podría ser que el entorno de un solo Trp se vea afectado por la

unión de los lípidos a la proteína, pero que su espectro de emisión alterado sea solapado u opacado por la emisión de otros Trps que no se ven afectados por la presencia del ligando. Los mismos ensayos fueron realizados con la proteína P17 y no se registró ningún cambio en la intensidad ni forma del espectro

2.3.5 Caracterización de P17: ¿se trata de una nemglobina?

La proteína P17 de *D. renale* es intensamente roja, mayoritaria en LPC y debe explicar el intenso color rojo de los gusanos. Es probable que contenga hemo como ligando, en común con muchas proteínas respiratorias en animales, y el color rojo es indicativo de que tiene hierro en su núcleo (57). Por lo tanto, P17 puede ser miembro de una clase de proteínas específicas de nematodos denominadas "nemglobinas" para distinguirlas de las hemoglobinas no relacionadas de vertebrados (aunque el término "hemoglobina" aún persiste para estas proteínas en la literatura sobre nematodos (43)). La función precisa de las nemglobinas todavía se debate, pero es probable que sean proteínas transportadoras de oxígeno similares a las hemoglobinas y mioglobinas de los vertebrados, aunque también podrían participar secuestrando el oxígeno en especies que son micro- o anaeróbicas (43,58). El estudio de P17 podría arrojar luz no solo hacia la biología de *D. renale*, sino también hacia el proceso evolutivo de dicha especie y su relación con el clado al que pertenece.

2.3.6 Análisis del espectro UV/visible de P17

Como primera instancia se decidió abordar un estudio que refleje el espectro visible de esta proteína. Basándonos en nuestra hipótesis de que se trata de una nemglobina y sabiendo que el espectro de absorción de las proteínas que contienen grupos hemo

muestran bandas de absorción muy intensas (banda Soret o banda B) en el rango 380-450 nm y que, además, a longitudes de onda en el rango 500-750 nm, contiene un conjunto de bandas de absorción más débiles (bandas Q). comparamos el espectro de P17 con el de citocromo c de caballo (marca SIGMA, C7752). El espectro se midió utilizando un espectrofotómetro t70 uv/vis PG instruments Lt.

Como resultado se observa que el espectro visible de P17 presenta bandas en posiciones esperadas y similares a las presentes en el espectro del citocromo c (Figura 12.2).

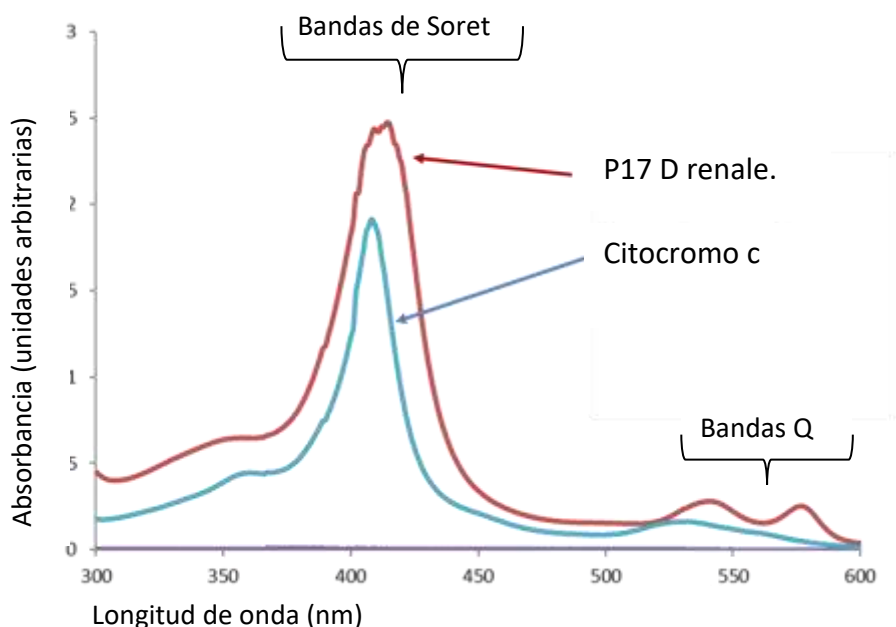


Figura 12.2: Espectro de absorción en la región UV-visible para P17 y citocromo c purificado.

2.3.7 Análisis de las características del ligando que está unido a P17.

Para comprobar el tipo de ligando que contiene esta proteína, primero se realizó una exclusión molecular, seguida de una purificación mediante HPLC en fase reversa (ver Apéndice 2). En este último paso, fueron separadas la proteína de su ligando quedando

en diferentes fracciones. Esto permitió dos tipos de análisis, por un lado, mediante espectroscopia de masa, se obtuvo la identidad del ligando y por el otro fue posible hacer un ensayo para verificar si la unión proteína- ligando es reversible.

2.3.8 Identidad de su ligando

Se tomó la fracción que luego de la purificación contiene el ligando (el segundo pico que se observa en el gráfico de la purificación por HPLC, ver Apéndice 2). Luego de liofilizar el contenido de la fracción conteniendo el ligando se resuspendió en etanol puro y se envió al servicio LANAIS PRO EM Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA donde se analizó la fracción mediante Espectrometría de Masas.

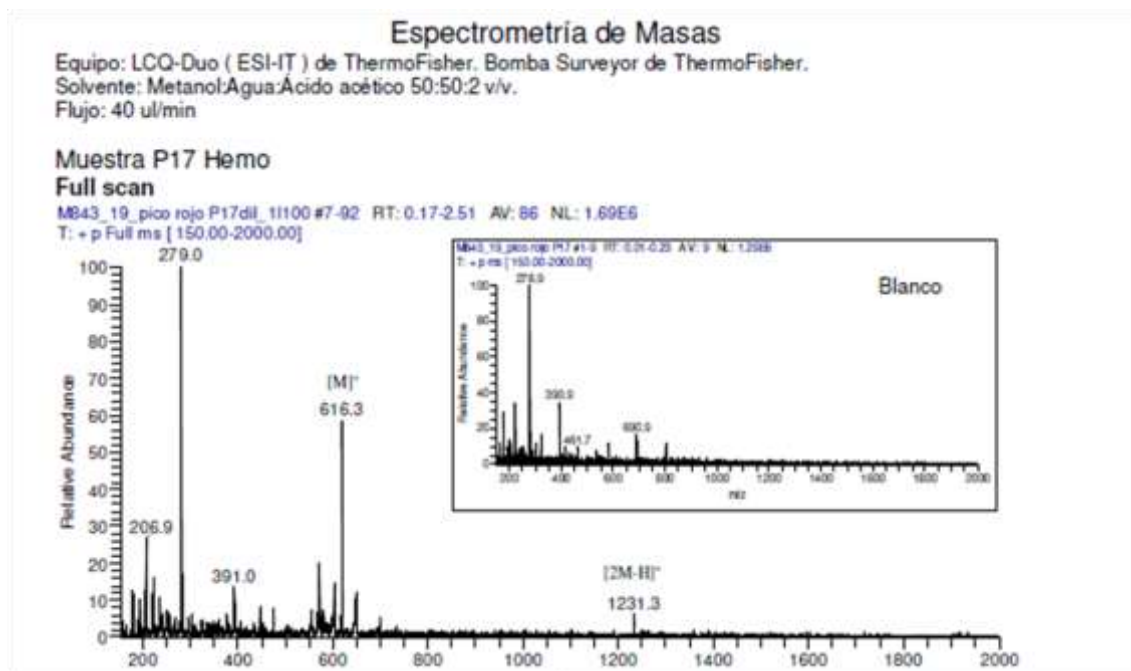


Figura 13.2: Perfil isotópico del ligando purificado mediante HPLC a partir de P17. Copia del informe emitido por el servicio de espectrometría de masas LANAIS PRO EM.

El informe que acompañó el resultado indicó que se detecta una macromolécula de peso molecular y perfil isotópico compatible con el espectro para un grupo hemo con Fe^{3+}

(C₃₄H₃₂FeN₄O₄) con una masa de 616.1773 Da, Figura 12.2. Dado este resultado, de aquí en adelante en este trabajo de tesis denominaremos “grupo hemo” al ligando en cuestión.

2.3.9 Análisis de la reversibilidad de la unión del grupo hemo a la proteína

Utilizando un gel de poliacrilamida 15 % en condiciones nativas se realizó una corrida electroforética que permitió observar si al incubar las diferentes fracciones resultantes de la purificación por HPLC; la proteína era capaz de volver a unir su grupo hemo (ver Apéndice 2). En la Figura 14a.2 se observa el resultado de la corrida sin ningún tipo de tinción. La banda roja que se observa en la calle donde se sembró LPC, corresponde a P17 tal cual se encuentra en dicho fluido, es decir sin ningún tratamiento. Por otro lado, la banda roja que se observa en la calle del gel correspondiente a P17 + hemo, es dicha proteína luego de su aislamiento (forma apo) reunida con el grupo hemo. Este resultado permitió concluir que la unión de apo P17 con su grupo hemo resulta reversible. En las bandas de los controles negativos usando la apo P17 (sin hemo) y albúmina como proteína que no une hemo, no se observa coloración. En la Figura 14b.2 se observa el resultado de teñir el gel nativo con Coomassie coloidal para comprobar la presencia de la fracción proteica.

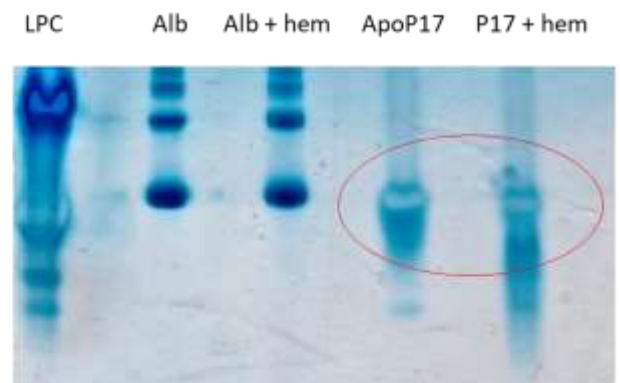
a**b**

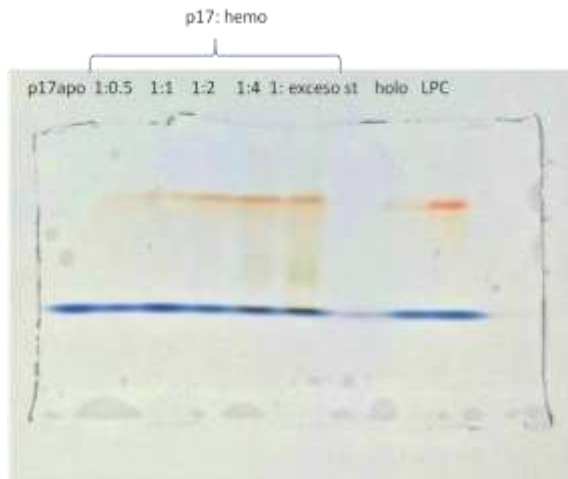
Figura 14.2 a: Gel nativo sin tinción

b: gel nativo teñido con coomassie blue, puedo ver como P17 retiene su color al unir su ligando. LPC= líquido pseudocelómico, Alb = albumina sérica, hem= grupo hemo aislado a partir de P17, apo P17 = P17 sin grupo prostético.

2.3.10 Análisis de la unión de hemina de cerdo con P17

Para confirmar los resultados anteriores, se realizó un ensayo similar al descrito en la sección anterior, pero usando distintas relaciones de proteína: hemina comercial purificada de cerdo (marca SIGMA código 51280) como posible grupo hemo a ser unido (ver Apéndice 2). En la Figura 15.2.a podemos observar y confirmar que el grupo hemo se une a P17. Particularmente, podemos observar en la calle correspondiente a apo P17, la ausencia de color rojo, debido a que en esta calle se encuentra la proteína P17 sin su ligando y luego se ve un aumento de la intensidad del color rojo, a medida que aumenta la relación proteína: grupo hemo. En el gel teñido con Coomasie coloidal (Figura 15.2.b) confirmamos que se encuentra proteína en todas las calles.

a



b

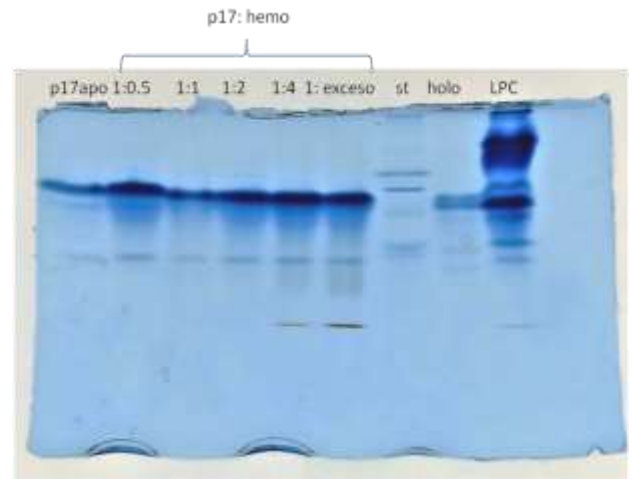


Figura 15.2 a: Incubación de apo P17 con cantidades crecientes de hemina comercial. En las calles del gel nativo podemos observar apo P17 (sin grupo hemo), y las diferentes relaciones Proteína: grupo hemo. (1:0,5, 1:1, 1:2, 1:4, 1: hemina en exceso) seguidas por el marcador de peso molecular(st), la proteína P17 purificada mediante exclusión molecular y la proteína en el LPC (en estas dos últimas en su estado nativo)

b: se observa el gel teñido con Coomassie blue coloidal.

2.4 Búsqueda de la identidad de las proteínas P44 y P17

2.5.1 Análisis de la secuencia de aminoácidos de P44 y P17

Por su tamaño y características de unión a ligandos hidrofóbicos, P44 parece ser un nuevo tipo de proteína que une lípidos presentes en nematodos. El corrimiento hacia el azul en la emisión al unirse a DAUDA es similar al observado en las proteínas NPA y FAR de nematodos (54,59), pero las formas procesadas postraduccionalmente de las

primeras son aproximadamente 14.4 kDa (aunque algunas especies tienen unidades combinadas más grandes) (60) y las proteínas FAR tienen un tamaño de aproximadamente 20 kDa (49,61,62). Para investigar si P44 exhibe alguna relación con proteínas conocidas de los nematodos, obtuvimos la secuencia N-terminal y varias secuencias de péptidos internos obtenidos mediante proteólisis (Figura 16.2). La búsqueda en las bases de datos de secuencias públicas, reveló que todas las secuencias de péptidos se alinean con la secuencia de una proteína de *Trichinella spiralis* que se describe como una proteína poli-cisteína y cola de histidina (PCHTP; Figura 9.2) (63). Las similitudes son convincentes dadas las alineaciones de cisteínas y aminoácidos hidrofóbicos voluminosos como el triptófano y la fenilalanina. Adicionalmente, también se encontró un grado considerable de similitud de secuencia con las PCHTP predichas para otras especies de *Trichinella* y también *Trichuris trichiura*. Es importante destacar que todas estas proteínas pertenecen, al igual que *D. renale*, a nematodos del Clado I.

Por otra parte, también se obtuvo la secuencia de aminoácidos N-terminal de P17 (TQNKPLLTAQMDXIHADA; código de aminoácido único). Una búsqueda inicial mediante BLAST en distintas bases de datos no arrojó alineamientos convincentes. Más aún, tampoco se obtuvieron resultados claros cuando se realizó el análisis en bases de datos actuales, con supuestas proteínas similares a globinas de nematodos del Clado I como, por ejemplo: mioglobina de *Trichuris trichiura* (A0A077ZHY0; Uniprot)), mioglobina de *Trichinella patagoniensis* (A0A0V1A2G5; Uniprot), globina de *Trichinella nativa* (A0A1Y3ES64), mioglobina de *Trichinella nelsoni* (A0A0V0RHU3; Uniprot).

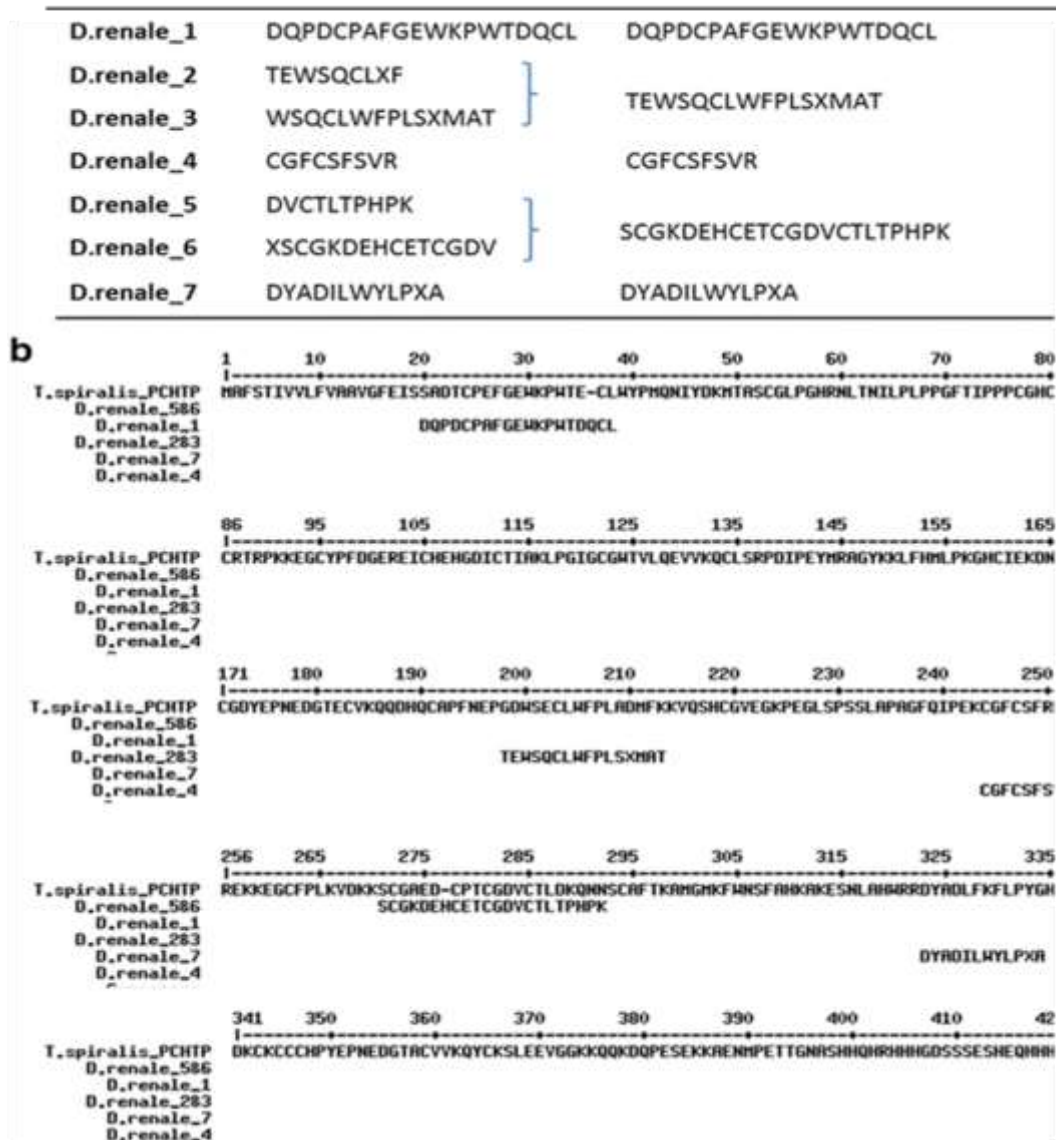


Figura 16.2 a: Primera búsqueda de ortólogos de P44 de *D. renale*. Secuencias de péptidos de P44 y cómo se combinaron para la alineación. Las secuencias se dan usando el código de una letra para los aminoácidos.

b: Alineación entre los péptidos obtenidos de P44 y la secuencia de aminoácidos predicha completa de la isoforma 2 de la proteína de policisteína con cola de histidinas de *Trichinella spiralis* (Ts-PCHTP; acceso NCBI AEQ29641). La alineación se realizó utilizando el conjunto MultAlin para la matriz de sustitución predeterminada blosum62 (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>). Aunque no se muestra, la alineación fue igualmente buena con secuencias de otras especies de *Trichinella*, y con la secuencia de una PCHTP de *Trichuris trichiura* (NCBI de acceso CDW54015). SignalP (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) predice que los primeros 21 aminoácidos en la secuencia

de *T. spiralis* son un péptido señal escindible, por lo que la proteína madura pronosticada comienza cerca de la secuencia del péptido N-terminal de P44 (D.renale_1).

2.5 Estudio del poder inmunogénico de las proteínas P44 y P17

2.5.1 Técnica de ensayo inmunoenzimático indirecto

En un primer momento, cuando se comenzó a estudiar la inmunogenicidad de las proteínas mayoritarias del LPC (P44 y P17), no estaba disponible información tal como su identidad, función biológica o si resultaban o no ser específicas de *D. renale*. Por otra parte, los conocimientos previos relacionados a proteínas mayoritarias de LPC de otras especies de nematodos indicaban que las mismas eran altamente inmunorreactivas (64). Este escenario determinó a considerar a P44 y P17 como posibles candidatas para una posible prueba diagnóstica.

Actualmente, se sabe que dichas proteínas son clado específicas, por lo cual existe la posibilidad de que los anticuerpos generados ante estas proteínas, puedan llegar a presentar reactividad cruzada, si es que el hospedador fue infectado, por otro parásito del mismo clado que *D. renale*. De todas formas, el estudio de la inmunogenicidad de P44 y P17 aporta a la caracterización de dichas proteínas y arroja información valiosa a la hora de comparar la biología de *D. renale* con el resto del clado al que pertenece.

Como describimos anteriormente, la información disponible sobre este parásito es muy escasa, no obstante, en el año 2015 surge un test diagnóstico desarrollado utilizando

antígenos provenientes de esófago de *D. renale* que permitía distinguir exitosamente perros infectados de aquellos que no habían adquirido la infección (65). Por lo cual se planteó una colaboración para probar esta técnica, pero utilizando las proteínas mayoritarias del LPC (P17 y P44) y compararlas con homogenato de esófago.

Los helmintos parásitos generalmente tienen una cutícula extracelular espesa, que protege la membrana plasmática hipodérmica (66). Adicionalmente, estas cutículas son diferentes en cada estadio del ciclo de vida(67), de este modo, soluciones antigénicas producidas a partir de la cutícula pueden no ser efectivas en la identificación de animales parasitados. La penetración de *D. renale* en los tejidos del hospedador ocurre por la acción de enzimas proteolíticas y lipolíticas producidas por glándulas esofágicas. Esa acción desencadena procesos de necrosis y coagulación (68,69) y tiene como efecto final la destrucción del riñón. El esófago posee un papel relevante en la interacción parásito/hospedador, razón por la cual fue seleccionado para la producción de antígeno y con este desarrollar un test diagnóstico basado en la técnica de ELISA (acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) (70).

En primera instancia, mediante la técnica de Dot blot (ver Apéndice 3), se comprobó que la P17 no presenta inmunogenicidad apreciable por lo que no se usó como antígeno para el desarrollo del test de ELISA (Figura 17.2).

Mediante la técnica de ELISA (ver Apéndice 3) podemos concluir que P44 discrimina entre sueros positivos y negativos al igual que el homogenato de esófago y que el LPC (Figura 18.2). Claramente los niveles de intensidad de absorbancia son más bajos debido a que no es comparable una proteína pura a un homogenato de proteínas en el cual

puede existir más de una proteína inmunogénica. Lo que sí podemos comparar en este sentido es la intensidad de absorbancia del LPC y el homogenato de esófago, en el caso de pensar un test diagnóstico el homogenato de esófago resulta tener mayor intensidad de absorbancia en igual concentración que el LPC, no obstante, faltarían estudios estadísticos que permitan discernir cuál de los dos discrimina mejor entre perros infectados o sanos. Finalmente, mediante la técnica de Western Blot (ver Apéndice3) se comprueba lo observado con el ensayo de ELISA (Figura19.2).

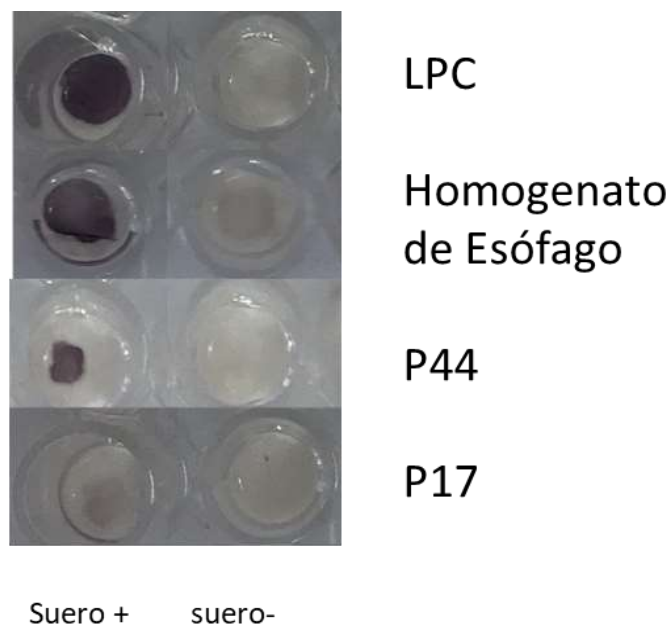
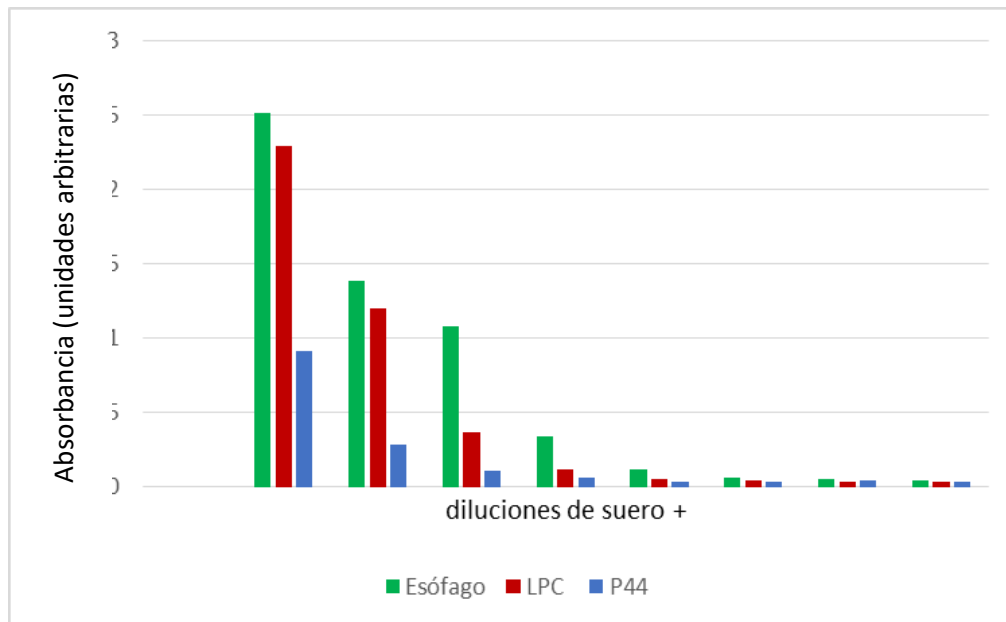


Figura 17.2: Dot blot en el cual se puede observar mediante la aparición de color, como P44 presenta inmunogenicidad comparable al LPC y el esófago, no así P17.

a



b

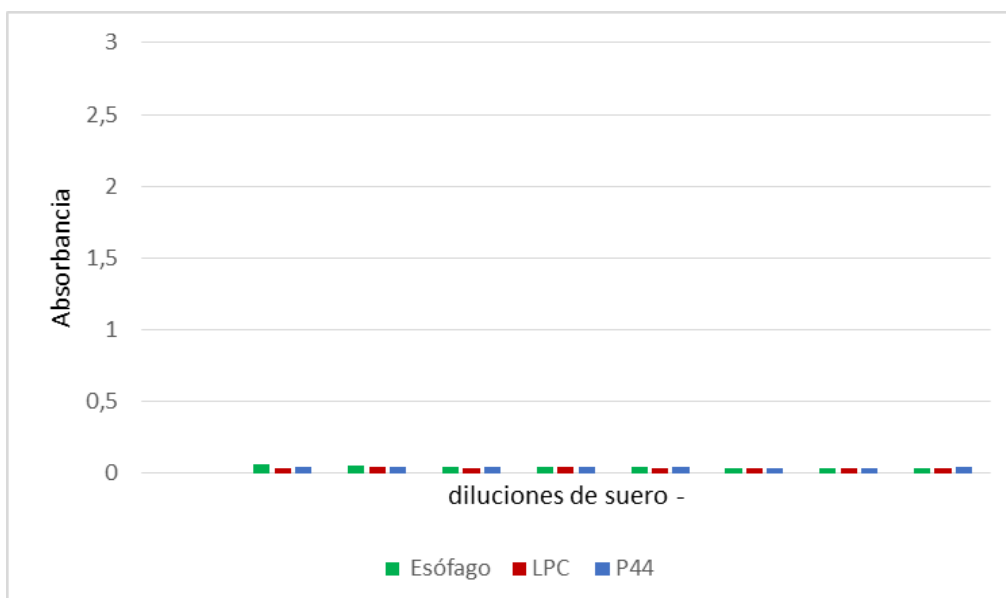


Figura 18.2 a: Valores de absorbancia de sueros de perros infectados o positivos

b: negativos para Dioctophymosis. Placa sensibilizada con 5 µgr/ml de antígeno y revelado con anticuerpo secundario anti-IgG de perro conjugado con peroxidasa.

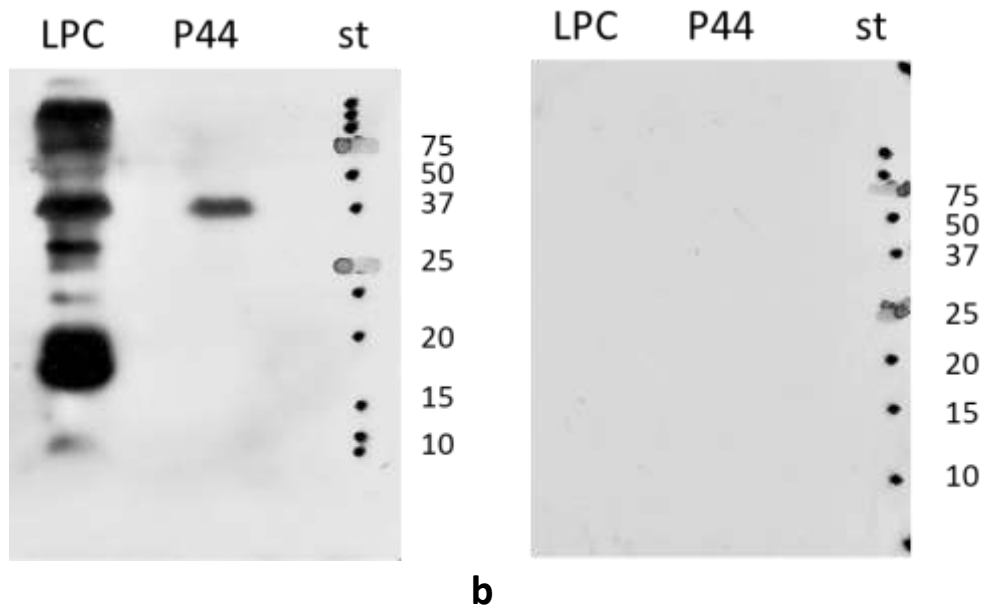


Figura 19.2: Western blot de LPC y P44 incubados con suero positivo Figura 19.2a y negativo figura19.2b para Dioctofimosis. Mediante este Western blot podemos confirmar la inmunogenicidad de P44.

2.6 Discusión

Presentamos un análisis bioquímico de proteínas del nematodo gigante de riñón *D. renale*, con particular énfasis en aquellas mayoritarias del líquido pseudocelómico. Las especies de nemátodos parásitos de animales se encuentran dispersas en el Phylum Nematoda, si nos centramos dentro del Clado I, al que pertenece *D. renale* (45) los *Dorylaimida* han recibido poca atención, excepto los de los géneros *Trichinella* y *Trichuris*, representantes de los cuales son sujetos a intensa investigación inmunológica y de biología molecular. Hemos comenzado a trabajar en *D. renale* debido a su importancia médica veterinaria y potencialmente en humanos, pero también debido a su posición filogenética dentro de un grupo de nematodos relativamente poco estudiado. El gran tamaño de los gusanos adultos presenta una

ventaja significativa para investigar sus componentes moleculares y celulares, igualados, hasta el momento, solo por los ascarididos del Clado III. Esto nos permitió aislar diferentes tejidos de machos y hembras, y su LPC se puede extraer fácilmente para proporcionar cantidades abundantes de sus proteínas constituyentes. En ese LPC encontramos dos proteínas que eran particularmente abundantes, una que confiere el color rojo intenso de los parásitos adultos y puede contener hemo, y la otra un tipo potencialmente nuevo de proteína de unión a lípidos.

El perfil proteico del LPC de machos y hembras adultos de *D. renale* (Clado I) es completamente diferente al de *Ascaris* y *Toxocara spp* de tamaño equivalente del clado III (36). Se estima que el último ancestro común de los dos clados vivió entre 500 y 650 millones de años lo cual apoya las claras diferencias observadas (71). Las proteínas principales en el LPC de grandes ascarididos que viven en el intestino, son las NPAs (por ejemplo, ABA -1A de *Ascaris suum*) (40,51), pero no encontramos indicios de que estén presentes en *D. renale*. Esto fue algo inesperado dado que esta familia de proteínas se ha encontrado en especies de nematodos de los clados III, IV y V (64). Además, hasta la fecha, todavía no hemos encontrado evidencia de genes que codifican para las NPAs en las bases de datos del genoma para *Trichinella spiralis* o *Trichuris spp*. Por lo tanto, es posible que las NPAs aparecieran como novedades en el progenitor común de Rhabditida (Clados III, IV y V; se sabe poco de la bioquímica de los nematodos del Clado II), o que se perdieron en el Clado I.

Los nematodos producen y secretan una gama inesperadamente amplia de tipos de proteínas de unión a lípidos inusuales, muchos de los cuales son estructuralmente distintos de los de sus huéspedes, y que han sido reconocidos como antígenos

principales en la infección (72,73). La adquisición y el transporte de lípidos es crucial para estos organismos debido a su incapacidad para sintetizar lípidos complejos (74,75) y, en el caso de parásitos grandes, necesitan distribuir lípidos insolubles entre el sitio de absorción y los tejidos desde donde los adquieren. Las funciones hipotéticas de las proteínas de unión a lípidos de helmintos incluyen funciones internas comunes a la mayoría de los organismos multicelulares, como la distribución de reservas de energía y la señalización de células en desarrollo. La secreción de proteínas que se unen a los lípidos por parte de los parásitos puede estar implicada adicionalmente en la interferencia y la manipulación de las funciones celulares o inmunes basadas en lípidos del huésped (72,73).

Las proteínas NPAs y las FAR de los nematodos no tienen contrapartes estructurales reconocibles en otros grupos de animales (72,73). Si bien aún queda mucho por establecer, es posible que P44 represente otra clase nueva de proteína de unión a lípidos que puede ser específica de los nematodos. La proteína con la que encontramos similitudes de secuencia de aminoácidos con P44 es una proteína inusual, las policisteína y cola de histidina (PCHTPs) de especies de los géneros *Trichinella* y *Trichuris* (Figura 16.2). Radoslavov y col. [29] encontraron que la proteína de *T. spiralis* Ts-PCHTP interactúa con DAUDA, pero no de manera convincente. Eso podría deberse a un plegamiento incorrecto de la forma recombinante de la proteína que se usó dado su número inusualmente alto de cisteínas, lo que podría conducir a una alta proporción de proteínas unidas incorrectamente a los disulfuros. Además, podría ser necesario deslipidizar la proteína para que la unión a DAUDA sea discernible. Curiosamente, estas PCHTPs son inusualmente ricas en

histidinas, lo que también es cierto para algunas unidades de las NPAs, en las que se ha encontrado que los péptidos ricos en histidina se unen a iones de zinc (MW Kennedy y A. Cooper, inédito). Por el momento, P44 se suma al grupo selecto de proteínas, todas específicas para nematodos, que inducen el mayor cambio al azul en la emisión máxima de fluorescencia de la sonda DAUDA, que es mayor que la observada con proteínas especializadas de unión a lípidos de vertebrados como proteínas de unión a ácidos grasos citoplasmáticos y albúminas séricas (50,51,76).

Las NPAs parecen ser los principales portadores de lípidos en la LPC de grandes ascarididos adultos (*Ascaris spp.* Y *Toxocara canis*), y se han reportado en muchas especies en los Clados III, IV y V (51,54). Las NPAs se sintetizan como grandes conjuntos en tándem de unidades que tienen secuencias de aminoácidos y propiedades de unión a los lípidos similares, que luego se dividen postraduccionalmente en múltiples copias de aproximadamente 14,4 kDa unidades (17,20,43). En los vertebrados, los portadores de lípidos equivalentes en la sangre serían las albúminas séricas, que son aproximadamente 67 kDa, monoméricas, transportan ácidos grasos y una gama de otros ligandos apolares y polares, y realizan una importante función osmótica en la sangre. La albúmina sérica en sí se deriva de eventos de duplicación de genes (31) para crear una proteína de un tamaño tal que no se pierda a través del filtro de tamaño del sistema excretor de los riñones de vertebrados. Una sorpresa, por lo tanto, es que las unidades únicas, pequeñas y altamente abundantes de las NPAs no se pierdan del LPC de un nematodo a menos que haya un filtro de bajo tamaño molecular en sus sistemas excretores, o un sistema de recuperación para evitar pérdidas. Este problema también puede aplicarse a P17 de *D. renale*, pero posiblemente no a su P44 debido a su mayor

tamaño. Si bien encontramos pruebas sólidas de que P44 es un tipo inusual de proteína transportadora de lípidos, queda por determinar si también tiene otras funciones transportadoras.

La proteína P17 de *D. renale* es roja, abundante en LPC y explica el intenso color rojo de los gusanos, debido a que contiene grupo hemo; una característica en común con muchas proteínas respiratorias en animales (23). Por lo tanto, P17 contaría como miembro de una clase de proteínas específicas de nematodos denominadas "nemoglobinas" para distinguirlas de las hemoglobinas no relacionadas de vertebrados (aunque el término "hemoglobina" aún persiste para estas proteínas en la literatura sobre nematodos (9)). La función precisa de las nemoglobinas todavía se debate, pero es probable que sean proteínas transportadoras de oxígeno similares a las hemoglobinas y mioglobinas de los vertebrados, aunque también pueden servir para secuestrar oxígeno en especies que son micro o anaeróbicas (9,24).

Cabe destacar que la P44 resulta con inmunogenicidad apreciable, no así la P17. Como se señaló anteriormente, las proteínas del esófago del adulto de *D. renale* proporcionan mejores antígenos para la detección serológica de perros infectados o expuestos a este parásito naturalmente, incluidos aquellos que no liberan huevos del parásito a través de la orina (31). Es interesante saber que el LPC del parásito tiene un valor equivalente, especialmente dada la relativa facilidad con la que se puede obtener en cantidad de parásitos adultos. Todavía no sabemos si las etapas pre-adultas migratorias de tejido de *D. renale* producen todas o alguna de las proteínas LPC que observamos en adultos, comprender el patrón de desarrollo de la expresión proteica del parásito sería

claramente valioso para diseñar un efectivo inmunoensayo para detectar infecciones prepatentes, de un solo sexo y ectópicas.

Además, nuestros resultados pueden no solo sacar a la luz LBP de helmintos parásitos que pueden ser estructuralmente nuevos, sino que también podrían revelar nuevos aspectos del metabolismo lipídico de los nematodos parásitos, un área apenas explorada en los nematodos del Clado I. Los datos funcionales que pueden surgir de este trabajo también podrían contribuir a una mejor comprensión de la relación parásito-hospedador en esta infección inusual. El análisis de P44 en particular también ha enfatizado la cercanía de *D. renale* a otros miembros parásitos altamente patógenos de los nematodos del Clado I, y puede proporcionar información valiosa sobre los sistemas de manejo de lípidos de parásitos como las especies *Trichinella* y *Trichuris*.

En resumen, nuestros primeros hallazgos comienzan a iluminar la biología de este parásito inusual a nivel molecular. Hemos descrito dos proteínas principales en el LPC: P44, se reveló que exhibe actividad de unión a lípidos, y P17, una "nemoglobina". Estos hallazgos también son importantes dado que proporcionan material e información pertinente a la función de los componentes de especies relacionadas más pequeñas.

2.8 Bibliografía

1. Burgos L, Acosta RM, Fonrouge RD, Archelli SM, Gamboa MI, Linzitto OR, et al. PREVALENCIA DE UN PARÁSITO ZOONÓTICO, DIOCTOPHYMA RENALE (GOEZE, 1782), EN CANINOS MACHOS DE UNA ZONA RIVEREÑA AL RÍO DE LA PLATA, PROVINCIA DE BUENOS AIRES, REPÚBLICA DE ARGENTINA. Revista de Patología Tropical. 2015 Jan 15;43(4).
2. Kennedy MW, Qureshi F, Fraser EM, Haswell-Elkins MR, Elkins DB, Smith H V. Antigenic relationships between the surface-exposed, secreted and somatic materials of the nematode parasites *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum*, and *Toxocara canis*. Clin Exp Immunol [Internet]. 1989 Mar [cited 2023 Mar 7];75(3):493. Available from: [/pmc/articles/PMC1541960/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1541960/)

3. Kennedy MW, Qureshi F, Haswell-Elkins M, Elkins DB. Homology and heterology between the secreted antigens of the parasitic larval stages of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum*. Clin Exp Immunol [Internet]. 1987 Jan [cited 2023 Mar 7];67(1):20. Available from: /pmc/articles/PMC1542555/?report=abstract
4. Xia Y, Spence HJ, Moore J, Heaney N, McDermott L, Cooper A, et al. The ABA-1 allergen of *Ascaris lumbricoides*: sequence polymorphism, stage and tissue-specific expression, lipid binding function, and protein biophysical properties. Parasitology [Internet]. 2000 [cited 2023 Mar 7];120 (Pt 2)(2):211–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10726282/>
5. Kennedy M. The nematode polyprotein allergens/antigens. Parasitology Today [Internet]. 2000 Sep 1 [cited 2023 Mar 7];16(9):373–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10951596/>
6. Kennedy MW, Qureshi F. Stage-specific secreted antigens of the parasitic larval stages of the nematode *Ascaris*. Immunology [Internet]. 1986 Jul [cited 2023 Mar 7];58(3):515. Available from: /pmc/articles/PMC1453479/?report=abstract
7. DAVENPORT HE. The haemoglobins of *Ascaris lumbricoides*. Proc R Soc Lond B Biol Sci [Internet]. 1949 [cited 2023 Mar 7];136(883):255–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18152153/>
8. Goldberg DE. The enigmatic oxygen-avid hemoglobin of *Ascaris*. Bioessays [Internet]. 1995 [cited 2023 Mar 7];17(2):177–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7748168/>
9. Blaxter ML. Nemoglobins: divergent nematode globins. Parasitol Today [Internet]. 1993 [cited 2023 Mar 7];9(10):353–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15463668/>
10. Blaxter M, Koutsovoulos G. The evolution of parasitism in Nematoda. Parasitology [Internet]. 2015 Feb 10 [cited 2023 Mar 7];142 Suppl 1(Suppl 1):S26–39. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24963797/>
11. Koehler AVA, Hoberg EP, Torres-Pérez F, Cook JA. A Molecular View of the Superfamily Dioctophymatoidea (Nematoda). Comp Parasitol [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2020 May 14];76(1):100–4. Available from: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1654/4366.1>
12. Franchini GR, Córscico B. Técnicas bioquímicas para el estudio de proteínas. Córscico B, Lockhart LJF, Franchini GR, Scaglia N, editors. Análisis estructural y funcional de macromoléculas [Internet]. 2013 [cited 2023 Mar 7];10–36. Available from: <https://docer.com.ar/doc/x850cnx>
13. Venyaminov SY, Vassilenko KS. Determination of protein tertiary structure class from circular dichroism spectra. Anal Biochem [Internet]. 1994 [cited 2023 Mar 7];222(1):176–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7856845/>
14. Meenan NAG, Ball G, Bromek K, Uhrín D, Cooper A, Kennedy MW, et al. Solution Structure of a Repeated Unit of the ABA-1 Nematode Polyprotein Allergen of *Ascaris* Reveals a Novel Fold and Two Discrete Lipid-Binding Sites. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2011 Apr [cited 2023 Mar 7];5(4). Available from: /pmc/articles/PMC3079579/
15. Rey-Burusco MF, Ibáñez-Shimabukuro M, Gabrielsen M, Franchini GR, Roe AJ, Griffiths K, et al. Diversity in the structures and ligand-binding sites of nematode fatty acid and retinol-binding

- proteins revealed by Na-FAR-1 from *Necator americanus*. *Biochemical Journal* [Internet]. 2015 Nov 11 [cited 2023 Mar 7];471(Pt 3):403. Available from: [/pmc/articles/PMC4613501/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2396975/)
16. Wilton DC. The fatty acid analogue 11-(dansylamino)undecanoic acid is a fluorescent probe for the bilirubin-binding sites of albumin and not for the high-affinity fatty acid-binding sites. *Biochem J* [Internet]. 1990 [cited 2023 Mar 7];270(1):163–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2396975/>
 17. Kennedy MW. The polyprotein lipid binding proteins of nematodes. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2000 Feb 9 [cited 2023 Mar 7];1476(2):149–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10669781/>
 18. Veerkamp JH, van Moerkerk HT, Prinsen CF, van Kuppevelt TH. Structural and functional studies on different human FABP types. *Mol Cell Biochem*. 1999 Feb;192(1–2):137–42.
 19. De Gerónimo E, Hagan RM, Wilton DC, Córscico B. Natural ligand binding and transfer from liver fatty acid binding protein (LFABP) to membranes. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2010 Sep [cited 2023 Mar 7];1801(9):1082–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20541621/>
 20. Kennedy MW, Brass A, McCruden AB, Price NC, Kelly SM, Cooper A. The ABA-1 allergen of the parasitic nematode *Ascaris suum*: fatty acid and retinoid binding function and structural characterization. *Biochemistry* [Internet]. 1995 May 1 [cited 2023 Mar 7];34(20):6700–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7756301/>
 21. Eftink MR, Ghiron CA. Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies. *Biochemistry* [Internet]. 1976 Feb 1 [cited 2023 Mar 7];15(3):672–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1252418/>
 22. Kennedy MW, Scott JC, Lo S, Beauchamp J, McManus DP. Sj-FABPc fatty-acid-binding protein of the human blood fluke *Schistosoma japonicum*: structural and functional characterization and unusual solvent exposure of a portal-proximal tryptophan residue. *Biochemical Journal* [Internet]. 2000 Jul 7 [cited 2023 Mar 7];349(Pt 1):377. Available from: [/pmc/articles/PMC1221159/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1221159/)
 23. Wilson MT, Reeder BJ. Oxygen-binding haem proteins. *Exp Physiol* [Internet]. 2008 [cited 2023 Mar 7];93(1):128–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17981931/>
 24. Adducco. The red substance of *Eustrongylus gigas*. *Arch Ital Biol*11: 52–69.
 25. Kennedy MW, Garside LH, Goodrick LE, McDermott L, Brass A, Price NC, et al. The Ov20 protein of the parasitic nematode *Onchocerca volvulus*. A structurally novel class of small helix-rich retinol-binding proteins. *J Biol Chem* [Internet]. 1997 Nov 21 [cited 2023 Mar 7];272(47):29442–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9368002/>
 26. Britton C, Moore J, Gilleard JS, Kennedy MW. Extensive diversity in repeat unit sequences of the cDNA encoding the polyprotein antigen/allergen from the bovine lungworm *Dictyocaulus viviparus*. *Mol Biochem Parasitol* [Internet]. 1995 [cited 2023 Mar 7];72(1–2):77–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8538702/>
 27. Solovyova AS, Meenan N, McDermott L, Garofalo A, Bradley JE, Kennedy MW, et al. The polyprotein and FAR lipid binding proteins of nematodes: shape and monomer/dimer states in

- ligand-free and bound forms. *Eur Biophys J* [Internet]. 2003 Aug [cited 2023 Mar 7];32(5):465–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12692694/>
28. Prior A, Jones JT, Blok VC, Beauchamp J, McDermott L, Cooper A, et al. A surface-associated retinol- and fatty acid-binding protein (Gp-FAR-1) from the potato cyst nematode *Globodera pallida*: lipid binding activities, structural analysis and expression pattern. *Biochemical Journal* [Internet]. 2001 Jun 6 [cited 2023 Mar 7];356(Pt 2):387. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11611111/>
 29. Radoslavov G, Jordanova R, Teofanova D, Georgieva K, Hristov P, Salomone-Stagni M, et al. A Novel Secretory Poly-Cysteine and Histidine-Tailed Metalloprotein (Ts-PCHTP) from *Trichinella spiralis* (Nematoda). *PLoS One* [Internet]. 2010 Oct 13 [cited 2021 Jul 27];5(10):e13343. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0013343>
 30. Kennedy MW. The polyprotein allergens of nematodes (NPAs) - structure at last, but still mysterious. *Exp Parasitol* [Internet]. 2011 Oct [cited 2023 Mar 8];129(2):81–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21741973/>
 31. Pedrassani D, Nascimento AA do, André MR, Machado RZ. Improvement of an enzyme immunosorbent assay for detecting antibodies against *Diectophyma renale*. *Vet Parasitol* [Internet]. 2015 Sep 15 [cited 2023 Mar 8];212(3–4):435–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26299933/>
 32. Tizard i A. *Imunologia Veterinária 5ª EDIÇÃO Tradução da 1998*.
 33. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Imunologia*. 2003;481–481.
 34. De Andrade C de LD, Meireles EJB, Pollini CLN, Fernandes ES. *Diectophyma renale* em cães / *Diectophyma renale* in dogs. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*. 2022 Mar 4;5(1):903–15.
 35. 33. Neves d. S; morais, a. N; nogueira, r. HG; chquilloff, m. AG. Ocorrência de *Diectophyme renale* (Goeze, 1782) em cães da região de Lages, Estado de Santa Catarina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, . 1983;35(5):665–73.
 36. Pedrassani d., nascimento a, machado RZ. Detention of IgG antibodies anti- *Diectophyme renale* (Goeze, 1782) in dogs of the São Cristóvão district, Três Barras county, Santa Catarina State for the Dot-ELISA. . XV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e do XI Seminário de Parasitologia Veterinária dos Países do Mercosul Resumos.Curitiba-PR. 2008;
 37. Mitreva M, Blaxter ML, Bird DM, McCarter JP. Comparative genomics of nematodes. *Trends Genet* [Internet]. 2005 Oct [cited 2023 Mar 8];21(10):573–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16099532/>
 38. Iberkleid I, Sela N, Brown Miyara S. *Meloidogyne javanica* fatty acid- and retinol-binding protein (Mj-FAR-1) regulates expression of lipid-, cell wall-, stress- and phenylpropanoid-related genes during nematode infection of tomato. *BMC Genomics* [Internet]. 2015 Apr 8 [cited 2023 Mar 8];16(1):1–26. Available from: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-015-1426-3>
 39. Franchini GR, Pórfido JL, Ibáñez Shimabukuro M, Rey Burusco MF, Bélgamo JA, Smith BO, et al. The unusual lipid binding proteins of parasitic helminths and their potential roles in parasitism

and as therapeutic targets. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids [Internet]. 2015 Feb 1 [cited 2023 Mar 8];93:31–6. Available from: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/34003>

40. Barrett J. Developmental aspects of metabolism in parasites. *Int J Parasitol*. 1987 Feb 1;17(1):105–10.
41. Cheng X, Xiang Y, Xie H, Xu CL, Xie TF, Zhang C, et al. Molecular Characterization and Functions of Fatty Acid and Retinoid Binding Protein Gene (Ab-far-1) in *Aphelenchoides besseyi*. *PLoS One* [Internet]. 2013 Jun 5 [cited 2023 Mar 8];8(6):e66011. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0066011>
42. Tweedie S, Paxton WA, Ingram L, Maizels RM, McReynolds LA, Selkirk ME. *Brugia pahangi* and *Brugia malayi*: A Surface-Associated Glycoprotein (gp15/400) Is Composed of Multiple Tandemly Repeated Units and Processed from a 400-kDa Precursor. *Exp Parasitol*. 1993 Mar 1;76(2):156–64.
43. He XM, Carter DC. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* 1992 358:6383 [Internet]. 1992 Jul 16 [cited 2023 Mar 8];358(6383):209–15. Available from: <https://www.nature.com/articles/358209a0>

Diversidad genética del nematode *D. renale*

3.1 Estudio de la variabilidad genética utilizando marcadores moleculares basados en el gen mitocondrial COX I

3.1 Estudio de la variabilidad genética utilizando marcadores moleculares basados en el gen mitocondrial cox I

La diversidad entre organismos es, en gran parte, consecuencia de las diferencias en las secuencias de ADN y de los efectos ambientales. Con el interés de comenzar a estudiar aspectos poblacionales de *D. renale*, y así entender mejor la biología del parásito en un aspecto evolutivo se planteó una colaboración con la Dra. Laura Kamenetzky Instituto De Biociencias, Biotecnología Y Biología Traslacional - Facultad De Ciencias Exactas Y Naturales - [UBA]. En dicho trabajo se realizó un estudio poblacional de muestras de *D. renale* provenientes de los alrededores del Río de La Plata. La estrategia que se utilizó fue la amplificación por PCR (ver Apéndice 4), y posterior secuenciación de un fragmento del gen mitocondrial cox I (Figura 1.3) para comparar las muestras entre sí y también con la información que está disponible en bases de datos públicas como GenBank a partir de muestras obtenidas en Japón (1), hasta este momento estos datos moleculares son los únicos con los que se contaba de *D. renale*.

a

```
TGTGAGTGCATCACATGTTCACTGTTGGTTTAGACGTTGATACACGTGCGTATTTTGCTGCTGCGAGTATAATCATTG  
GTATCCCAACAGGGGTAAAAGTATTTAGTTGATTGGCTA
```

b

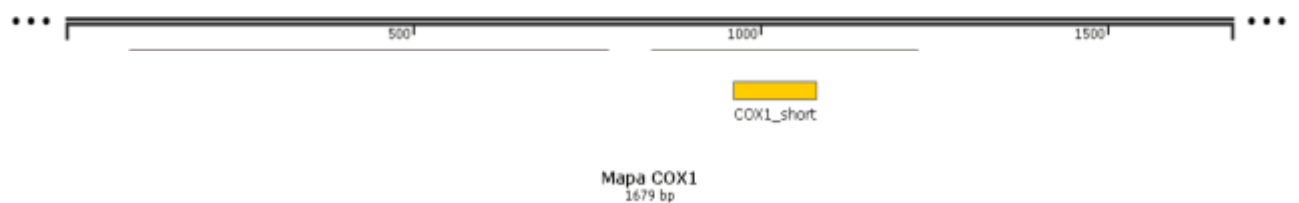


Figura 1.3 a: Secuencia del gen mitocondrial *cox1* de *Dioctophyme renale* para la subunidad I de citocromo oxidasa, región codificante parcial (GenBank: EU394733). Resaltado en rojo, fragmento del gen mitocondrial *cox I* amplificado (*cox1_short*).

b: Mapa genómico que muestra la posición del marcador utilizado en un contig conteniendo el gen *cox1* mitocondrial de *D. renale*.

	10	20	30	40	50	60	70
COX I	TGGTTTAGACGTTGATACACGTGCGTATTTTGCTGCTGCGAGTATAATCATTGGTATCCCAACAGGGGTAAAAG						
DR1	A.....T.....G.....				C.....T..G..G.....		
DR2	A.....T.....G.....				C.....T..G..G.....		
DR3	A.....T.....G.....				C.....T..G..G.....		
DR4	A.....T.....G.....				C.....T..G..G.....		
DR5	A.....T.....G.....				C.....T..G..G.....		
DR6	A.....T.....G.....				C.....T..G..G.....		
DR7	A.....T.....G.....				C.....T..G..G.....		
DR8	A.....T.....G.....				C.....T..G..G.....		
DR9	A.....T.....G.....				C.....T..G..G.....		
DR10	A.....T.....G.....				C.....T..G..G.....		
DR11	A.....T.....G.....				C.....T..G..G.....		
G	A.....T.....G.....				C.....T..G..G.....		

Figura 2.3: Alineamiento de secuencias figura que corresponde a un fragmento del gen mitocondrial *cox I* encontrado en las bases de datos públicas (Japón) (GenBank: EU394733), DR1, DR2, DR3, DR4.... DR11 corresponden a las secuencias del fragmento de *cox I* amplificado mediante PCR a partir de muestras de *D. renale* encontrados en perros, en Argentina. G corresponde a la secuencia del fragmento de *cox I* amplificado a partir de una muestra de *D. renale* encontrado en un gato, en Argentina (2).

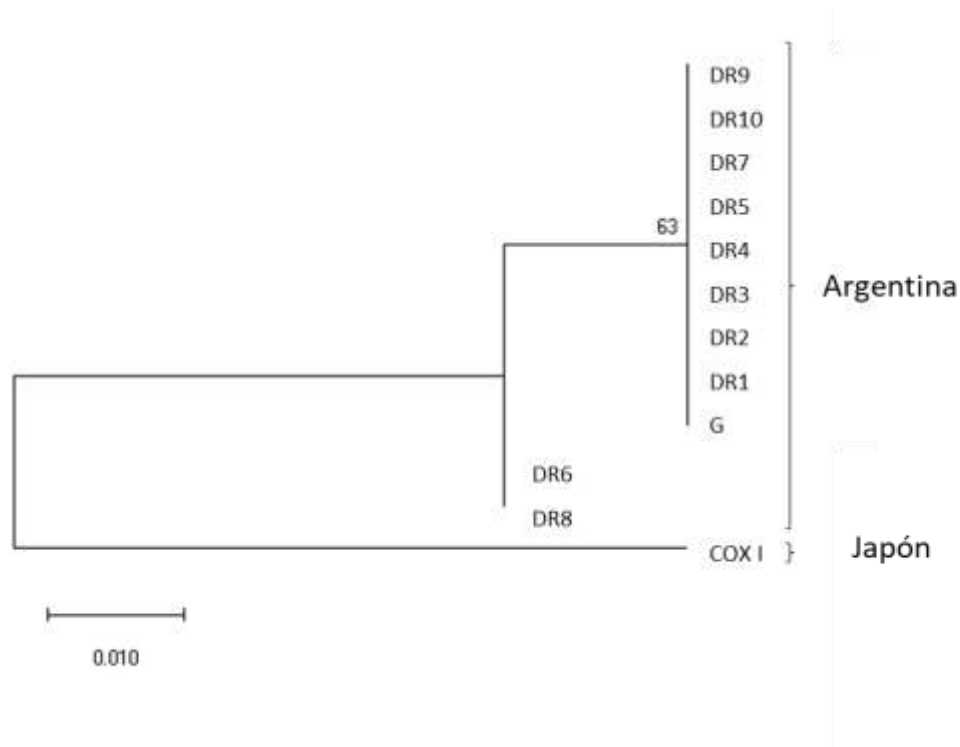


Figura 3.3: Árbol de máxima verosimilitud para todas las secuencias de *cox I* obtenidas incluyendo las publicadas de Japón. El árbol está dibujado a escala, con las longitudes de las ramas medidas en el número de sustituciones por sitio.

En el alineamiento de secuencias mostrado en la Figura 2.3 se puede observar que de los setenta y cuatro nucleótidos analizados se observan al menos seis SNPs (polimorfismo de nucleótido único) conservados que podrían indicar diferencias con respecto a las muestras asiáticas.

Finalmente, en la figura 3.3 se puede observar que las muestras de *D. renale* que corresponden a Argentina (Río de La Plata) quedan claramente separadas en un nodo distinto al de la secuencia asiática (secuencia *cox I*). Por otra parte, dentro del grupo de muestras rioplatenses quedan separadas en dos nodos dentro del árbol debido a diferencias observadas en los SNPs (Figura 2.3). Es decir, no solo son diferentes a las asiáticas, sino que también presentan diferencias entre sí. Si bien el fragmento

amplificado es muy pequeño (~70nt) se encuentra diversidad. Nuestra hipótesis es que, si se analiza un fragmento mayor o se incluyen otros fragmentos del gen, probablemente se encuentren mayor número de diferencias y por ende mayor diversidad. Estos resultados han dado pie para seguir analizando más muestras de otras regiones/hospedadores y hacer un estudio poblacional más profundo.

Bibliografía

1. Tokiwa T, Ueda W, Takatsuka S, Okawa K, Onodera M, Ohta N, et al. The first genetically confirmed case of *Diectophyme renale* (Nematoda: Dioctophymatida) in a patient with a subcutaneous nodule. *Parasitol Int* [Internet]. 2014 Feb [cited 2023 Mar 8];63(1):143–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24095916/>
2. Butti MJ, Gamboa MI, Terminiello JD, Franchini GR, Giorello AN, Maldonado LL, et al. *Diectophyme renale* in a domestic cat (*Felis catus*): Renal location and nephrectomy. *Vet Parasitol Reg Stud Reports*. 2019 Dec;18:100339.

Generando un sólido punto de partida: primeros datos genómicos y proteómicos de *D. renale*

4.1 Obtención del genoma de *D. renale*

4.2 Genoma de *D. renale* versión V1

4.3 Aplicaciones de los datos genómicos: Validación de anotación de proteínas y análisis de la calidad del genoma de *D. renale*

4.4 Búsqueda del número de cromosomas de *D. renale*

4.5 Obtención del proteoma de *D. renale*

4.6 Análisis de los datos proteómicos

4.7 Estudios del metabolismo de *D. renale* a partir de datos genómicos y proteómicos

4.8 Resumen del capítulo

4.1 Obtención del genoma de *D. renale*.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la información en relación con datos moleculares tanto de este nematode parásito como de la mayoría de los nematodes de su mismo clado es muy escasa. Un claro ejemplo es la especie parásita *Soboliphyme baturini*, para la cual existen datos moleculares genómicos pero los mismos presentan una pobre anotación de sus genes o de muy baja calidad (<https://www.uniprot.org/>)(1). Como contribución, fruto de los primeros pasos de nuestro trabajo en el tema, se logró aislar y purificar proteínas mayoritarias del LPC de *D. renale* y por diferentes estudios de caracterización se llegó a darles una identidad y posible función biológica (Capítulo 2), además se abordó un estudio poblacional preliminar (Capítulo 3) pero lo suficientemente útil como para concluir que tenemos variabilidad genética dentro de la población de *D. renale* de Argentina y con francas diferencias con respecto a la muestra de Japón. Si bien estos datos suman información muy valiosa la misma sigue siendo escasa. En este escenario es indiscutible la necesidad de contar con datos genómicos y proteómicos para poder abordar un gran número de incógnitas referidas a *D. renale* de manera específica, así como también en relación con otras especies dentro del Phylum. Algunos de los interrogantes planteados hasta el momento son: P17 ha demostrado ser una hemo-proteína ¿puede *D. renale* sintetizar su grupo hemo?; participa P17 en el transporte de oxígeno? ¿cuántas globinas más expresa?; P44 ha demostrado unir ácidos grasos, ¿es el único tipo de proteína que une lípidos?; o preguntas tales como ¿de las proteínas que expresa, cuales son proteínas específicas de *D. renale*? ¿cuáles son

clado específicas? ¿Cuánto se diferencia su genoma y su proteoma del resto de los nematodos del clado? Finalmente, las preguntas son innumerables, lo indiscutible, era la necesidad de trabajar en el sentido de generar datos moleculares sobre *D. renale*. Por lo antedicho hemos contribuido a abordar la secuenciación de su genoma, así como también el estudio de su proteoma.

4.2 Genoma de *D. renale* versión 1 (V1)

Este trabajo se realizó en colaboración con la Dra. Laura Kamenetzky. Para los pasos iniciales de dicho proyecto, se aportó en la obtención de ejemplares y extracción de ADN (ver Apéndice 4) para proveer material para secuenciación del genoma y el número de cromosomas de *D. renale*. En paralelo se secuenciaron los transcriptomas de ejemplares machos y hembras disectados en distintos tejidos. Las reacciones de secuenciación se realizaron en el laboratorio del Dr. Mark L. Blaxter de la Universidad de Edimburgo, Escocia. Como primeros datos, a partir de muestras de *D. renale* macho, surge que el tamaño del genoma de una sola copia es aproximadamente de 280 millones de pares de bases de ADN (Mb) y el tamaño total del genoma es de aproximadamente 400 Mb. Adicionalmente se observó un alto contenido de secuencias repetitivas, se estimó un 50% de elementos repetitivos, incluyendo conservados y nuevos, lo que no es menor a la hora del ensamblado. Cuando se obtuvieron los resultados de transcriptómica se pudo anotar el equivalente a 350 Mb del genoma. Mas aún, se anotaron alrededor de 16.600 genes codificantes para proteínas (datos aun no publicados).

Estos primeros resultados del genoma estuvieron disponibles en enero de 2021 pudiendo así generar la primera predicción de proteínas a partir del genoma V1 de *D. renale*. Esta predicción nos permitió encarar diferentes estrategias tanto para obtener nueva información, así como también usar la información con la que ya contábamos para evaluar y validar la calidad de los datos que se habían obtenido.

4.3 Aplicaciones de datos genómicos

V1: Validación de anotación de proteínas y análisis de la calidad del genoma de *D. renale*

En esta sección se describirán algunas de las aplicaciones que pudieron realizarse utilizando los datos genómicos obtenidos trabajando en colaboración con la Dra. Kamenetzky. Una de las estrategias pensadas para evaluar los datos genómicos V1 fue la de hacer una predicción de proteínas a partir de este y realizar búsquedas, tanto de proteínas para las cuales no tenemos información alguna salvo la existencia e importancia en otros organismos, así como la búsqueda de P44 y P17 en donde contamos con datos concretos de su expresión en *D. renale*.

4.3.1 Predicción de proteínas a partir del genoma V1, primeras búsquedas.

A medida que surgían los primeros datos genómicos, surgía también la necesidad de pensar estrategias para evaluarlos, por lo cual se realizó una predicción de proteínas a partir del genoma V1 de *D. renale* y se evaluó la presencia de genes y determinadas rutas

metabólicas de importancia en nematodos. Una de las primeras búsquedas realizadas fueron proteínas de unión a lípidos en general, LBPs (del inglés lipid binding protein). De todas las LBPs conocidas y descritas en parásitos helmintos (2), las únicas encontradas en *D. renale*, fueron las proteínas que unen ácidos grasos (FABPs, por sus siglas en inglés Fatty Acid Binding Protein). Estas proteínas están ampliamente distribuidas en el reino animal y son consideradas de importancia dado que la mayoría de los nematodos parásitos carecen de las rutas de síntesis de ácidos grasos y esteroides (ver Apéndice 6) (2) Estos organismos dependen entonces del suministro de estos nutrientes desde sus hospedadores. La incorporación y transporte de dichos lípidos es de vital importancia para estos organismos y se propone que las FABP podrían participar de este proceso.

Por otra parte, se buscaron también proteínas que intervienen en la síntesis del grupo Hemo. Los gusanos de vida libre, incluido el organismo modelo *Caenorhabditis elegans*, y los nematodos parásitos no pueden sintetizar el grupo hemo *de novo*. En este mismo sentido si el organismo no puede sintetizar un compuesto probablemente necesite adquirirlo con la dieta. En base a lo antedicho, se realizó la búsqueda de genes sensibles a grupo hemo o HRGs (por su sigla en inglés, Heme Responsive Gene), los cuales han sido descritos con función de captación de grupo hemo exógeno.

Las proteínas encontradas en la primera búsqueda en nuestra base de datos para las FABPs fueron siete (Figura 1.4).

Código <i>D. renale</i>	Secuencia de aminoácidos (formato FASTA)
DREN_g7476.t1	MDSQFVGRFKLVSSNFEEFMKTLGINAVLRKMGNLIVPVVEFTIENDVWTIRYYTVFRKLQLSFRLNEEFEEVTPDGRKVLMLSCENVVCKRVLKRIS
DREN_g9548.t1	MDNFIGSYNAVKTENLEAYFQARGVPWPIRKILFTVDPKTTTRQFKRNDDGSFTYTDKGSSRYPVSWTFKLGETFQAHGYDNKEQKVTFEMSADGKKLLEHHRKVDDDTPTFEHSFEGDTLVWSMVTSEAVGKWWYKK A

DREN_jg8622.t1	MLTLVRFSETHQSAYRGVSIKGTANMAEFCGKYELLSRDNFDKYLEKSGFTPEQIAKFTASKTESVVIAT GDDWCVTLEKAEGKREFKFKLDKESDSVSYAGKPMKILCTYGS DGRMHLKATEEKRVTEVTWVLHGKNLT LEFFT EGIMAAIHLKKL
DREN_jg7832.t1	MDNFIGSYNAVKTENLEAYFQARGVPWPIRKILFTVDPAKTTTRQFKRNDGGSFTYTDKGSSRYPVSWTFKL GETFQAHGYDNKEQKVTFEMESADGKKLLEHHRKVDDDTPTFEHSFEGDTLVWSMVTSEAVGKCRQF WPRGTGHRVSLIVARSAHPYQLRPLVDEPRSMRRPHSFLFPVGS AHADSAERRSKT
DREN_jg1011.t1	MDSQFVGRFKLVSSNFEEFMKTLGTLIWNTLFHFTASGLPYCINAVLRKMGNLIVPVVEFTIENDVWTIRY YTVFRKLQLSFRLNEEFEEVTPDGRKVLTVFTLDDDGKLVQRQKALKTNEKDSVIIEVREENMFVMLSCEN VVCKRVLKHAPNNYMMFVLQCKKAEAAFEIGPLYKNWSRVLMFGWSSSVGMKEKT
DREN_jg8042.t1	MLTESTASACDSTKLRRPLACFFIQRRTRCVSDERSGDFRWEARQTRTFSDRCWWRERQERLRRSVGHG SQCSSVLRSLRRPRAERAIA NTGRERRPSAATVWLVAGGSPSDRGLSCAAALSDALCARPTDVRPAHDGI RDSDSRWLSLTGDQRP AIERAARANGQKADDRAMAENFVGKYKLESSENFDEYMKKLGVD FATRKIASVL SPTLEISVNGSEWTVKTLSTFKSETAVFELGKEVETTTLDG
DREN_g754.t1	MLTESTASACDSTKLRRPLACFFIQRRTRCVSDERSGDFRWEARQTRTFSDRCWWRERQERLRRSVGHG SQCSSVLRSLRRPRAERAIA NTGRERRPSAATVWLVAGGSPSDRGLSCAAALSDALCARPTDVRPAHDGI RDSDSRWLSLTGDQRP AIERAARANGQKADDRAMAENFVGKYKLESSENFDEYMKKLGVD FATRKIASVL SPTLEISVNGSEWTVKTLSTFKSETAVFELGKEVETTTLDGRKVKMLCTLENGKLVQKQKATKQGDKDEMI REINGDQLITICKCEDVTCKRTYKRM

Figura 1.4: Secuencias de las siete FABPs encontradas en la predicción generada a partir del genoma V1 de *D. renale*, en formato FASTA.

Un posterior análisis de las secuencias de FABPs encontradas mediante el software InterProScan, arrojó que ninguna tiene péptido señal. Este resultado es importante dado que en nematodos se han descrito proteínas que unen ácidos grasos que son secretadas y forman parte del líquido perivitelino (3) Al realizar una segunda ronda de búsqueda utilizando BLAST en la base de datos NCBI todas dan hits con FABPs de nematodos confirmando la presencia del dominio de unión a ácidos grasos.

En la búsqueda de enzimas que catalizan los siete pasos secuenciales para sintetizar el grupo hemo a partir del primer precursor universal, el ácido δ -aminolevulínico, no obtuvimos resultados de ningún tipo concluyendo que no existen en nuestra base de datos proteínas que muestren hits. Este resultado era esperado dado que hasta el momento no hay nematodos que presenten la vía completa de síntesis *de novo* del grupo hemo.

En cuanto a los HRGs, tenemos 2 proteínas que dan hits con HRG-1(4). Esta proteína es uno de los transportadores de grupo hemo involucrado en la captación y tráfico de hemo dentro del intestino de *C. elegans*(5). Estos resultados, apoyan la hipótesis de que *D. renale* estaría captando hemo exógeno (ver Figura 2.4). En este caso sería a partir de los tejidos de riñón y/o sangre de su hospedador definitivo. Esto es de suma importancia debido a que el proceso de incorporación de hemo representaría un potencial blanco terapéutico. Más adelante en este trabajo, abordamos un análisis proteómico que nos permite confirmar que *D. renale* no posee la vía de síntesis para el grupo hemo.

Código <i>D. renale</i>	Secuencia de aminoácidos (formato FASTA)
>DREN_jg7497.t1	MCSRLCSVTGRIVFSVLGIIAGLLAAVLFACQYRNFNATAWGLISSALATATLVLHLK WRNESLIVHRSRLTTVMLFGCVGQLAGACAMSTYVAVALLQGQGLQPMYGENY WVALVWAFMTWKWAFQLFWFARKYRREYEAQSLFKTIDGTYSVPEYT
>DREN_jg5204.t1	MWLLNVHIFMAALWLVCGLVGGVCFASVFHNYTTACWGVVSALFAGLTLGLHLK QKYGTDFDGHRRLLKWLMLVGCIGQLAGCSGMSSALSIAIVLGPALQVYGENQ WLALVWSFMTWKWSFLTFFYARKYKAIYKRLKNAKDASEP

Figura 2.4 Secuencias relacionadas a HRG-1 de *C. elegans*

Dados los resultados de las búsquedas propuestas, para realizar un análisis del proteoma predicho a partir de la versión 1 del genoma de *D. renale*, podemos concluir que estas concuerdan con lo esperado, las secuencias de proteínas dan resultados que nos permiten comprobar la identidad mediante ortología en otros nematodos

4.3.2 Anotación de P44 en GenBank como Dorilipoforina.

El 28 de marzo del 2021 pudo sumarse a las bases de datos públicas de GenBank la secuencia de la proteína P44 (GenBank: MW014827.1). Dicha secuencia se consiguió

mediante la búsqueda en el genoma V1 de *D. renale*. Para ello se utilizó el software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool + 2.13.0 NCBI) usando como carnada los péptidos obtenidos por proteólisis mostrados anteriormente (ver Capítulo 2) y analizados por Espectrometría de Masa (IQUIFIB, CONICET, UBA).

Listado de péptidos con los que se realizó la búsqueda:

Origen del péptido	Secuencia de aminoácidos
Secuencia N-terminal,	DQPDCPAFGWKPWDQ
Fragmento tríptico	TEWSQCL
Fragmento tríptico secuenciado <i>de novo</i> ,	CGFCSFSVR, EINMPTWR, EPECTPWGQR
Fragmento por tratamiento con proteasa Glu-C	CLWFPLSKMAT, DYADILWYLPXA
Fragmento por tratamiento con proteasa Lys-C	DVCTLTPHPK, XSCGKDEHCPT

En la Figura 3.4 se muestra la secuencia en formato FASTA de Dorilipoforina (o P44) tal y como fue depositada en Gene Bank, en color rojo se puede observar la ubicación de los diferentes péptidos usados para la búsqueda.

> DREN_jg2306.t1 / DREN_g2533.t1

LNSRFLGRSDQPDCPAFGWKPWDQCLWYPLQNMHEKVEHACGIETHRNMSIMPTPAGFHLPDRCGHCSFK
VRCRTRPAKDGCFPAETESKVCHEFKDVCTLTPHPKFGCHWQVYKEAIRQCNRADIKWQRKGYEKLETLPD
GHCVKKGNECKCCGGYYPNLDGTQCYKMREPECTPWGQRTEWSQCLWFPLSKMATDLEKYCDVDYKTPTYL
TQVPTPAGFHIPEKCGFCSFSVRQCKREKKDGCFLRIEKRSCGKDEHCPTCGDVCTLKKQNGSCEWTNEMLMG
MWKKFESKAKELNMPTWRREGYADILKYLPAKCKAVGDECKCCCHPYHPNEDGTCVPQEYCKSPKELQHEH
KHEH.

Figura 3.4. FASTA de Dorilipoforina (GenBank: MW014827.1 proteína: QTE33903.1, código en genoma de *D. renale*: DREN_jg2306.t1 / DREN_g2533.t1)

Es de destacar que como resultado de la búsqueda por BLAST no solo encontramos la secuencia de P44 (DREN_jg2306.t1 / DREN_g2533.t1) expuesta anteriormente (la cual presenta el mejor valor de score), sino también una serie de genes que podrían estar

emparentados. Dichos genes se muestran a continuación en una lista de acuerdo al score obtenido durante el análisis:

Secuencias que producen alineamientos significativos:	Score (Bits)	E Value
DREN_jg2306.t1/ DREN_g2533.t1	751	0.0
DREN_jg2307.t1	427	8e-150
DREN_jg2277.t1/ DREN_g2512.t1	350	2e-119
DREN_jg2333.t1/ DREN_g2561.t1	309	9e-104
DREN_jg8732.t1/ DREN_g6726.t1	126	4e-33

Es importante destacar que en algunos casos tenemos más de un código para referirnos a la misma proteína, esto es debido a que durante la anotación del genoma se utilizaron distintas estrategias para la predicción de genes. Por un lado, tenemos genes anotados que surgieron a partir de usar softwares entrenados con estructuras génicas de diferentes nematodos (correspondientes al código jg) y otros genes que surgieron de una predicción de *novo* (correspondientes al código g). En muchos casos quedaron secuencias codificantes idénticas las cuales han persistido luego de un ordenamiento eliminando redundancias debido a un ajuste erróneo. Esto ya ha sido corregido en la actualidad no presentando ningún tipo de impacto sobre nuestro análisis.

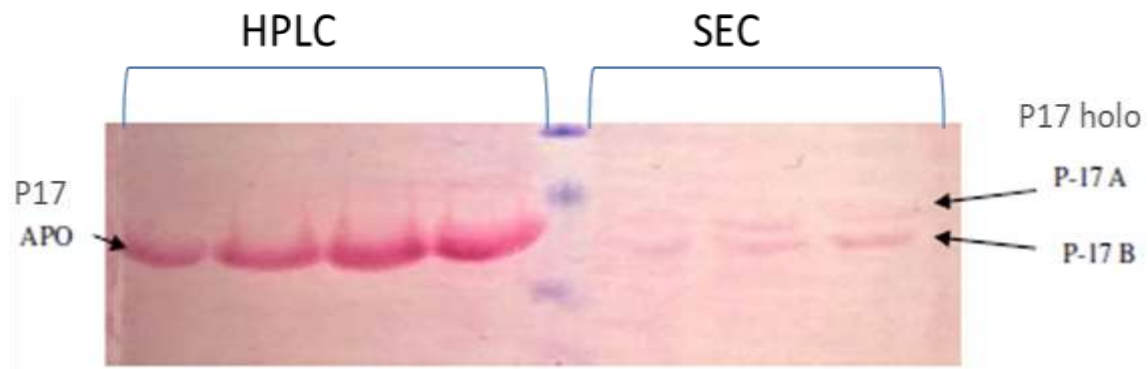
Todas las proteínas de la lista anterior contienen péptido señal y debido a que contienen la mayoría de los péptidos obtenidos por espectroscopia de masas y un buen alineamiento entre sí, podríamos considerar que son de la misma familia (ver Figura 4.4).



Figura 4.4: Alineamiento de secuencias relacionadas con P44, realizado con el programa CLC sequence Viewer 8.0. Los parámetros utilizados fueron: Gap open cost =10, gap extensión cost =1, very accurate (slow). En el rectángulo rojo se visualizan los péptidos señal encontrados usando el programa Signal P-5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>).

4.3.3 Búsqueda de P17, en la predicción de proteínas hecha a partir del genoma V1.

Así como se pudo encontrar la secuencia de aminoácidos para P44 en el genoma V1 de *D. renale*, se procedió a realizar una búsqueda detallada de P17. Este caso presentaba el agravante de contar con menos información sobre la secuencia de dicha proteína. Como evidencia preliminar, se conocía la existencia de más de una banda roja observadas en geles nativos (ver Capítulo 2) y se contaba con la secuencia N-terminal, pero esta no había arrojado resultados convincentes al realizar una búsqueda mediante BLAST en bases de datos públicas. Por todo lo anterior, se diseñó un ensayo que nos permitió estudiar las especies moleculares presentes en la fracción obtenida luego de la purificación por exclusión molecular (Capítulo 2) y al mismo tiempo, buscar el N-terminal obtenido, en nuestra base de datos generada a partir del genoma V1. Para esto, se tomó P17 purificada tanto en su forma holo (surgida luego de una exclusión molecular) como en su forma apo (luego de separarla del grupo hemo mediante HPLC), y ambas fueron resueltas mediante SDS page para finalmente ser transferidas a una membrana de PVDF mediante electro transferencia. La membrana teñida con rojo Ponceau fue enviada al servicio de Espectrometría de Masas LANAI PRO EM (IQUIFIB-CONICET-UBA) como se muestra en la Figura 5.4.



RESULTADOS	
APO: T-T-(R)-N-K-P-L-L-T-A-Q-M-D-K-I-H-A-D-A-E-N-G-G-E-F	57 picomoles
P17-A: * T-T-X-N-K-P-L-L-T-A-Q-M-D-K	7 picomoles
* G-G-M-V-A-Q-E-K-(S)-D	6 picomoles
P17-B: * G-A-P-V-E-H-G-T-D-D-P-R-A-T-S	32 picomoles
* E-E-X-X-K-D-M-X-F-N	8 picomoles

Las asignaciones entre paréntesis son tentativas. La X significa que no se encontró AA asignable para esa posición.

Figura 5.4. En la parte superior de la figura podemos observar la membrana de PVDF donde están discriminadas las bandas correspondientes a la proteína apo- es decir sin su ligando obtenidas luego del paso HPLC y las dos bandas señaladas con flechas a las cuales se les asignó la nomenclatura de P17 A y P17 B obtenidas luego de la cromatografía de exclusión molecular (SEC). Más abajo en la figura observamos una tabla con los péptidos correspondientes a cada banda.

Como resultado de la corrida electroforética (Figura 5.4, panel superior) se observa que hay más de una banda en la fracción que corresponde a la proteína holo, luego de la exclusión molecular, por lo que se decidió secuenciar los N-terminal de las proteínas que se encontraban en ambas bandas. De este estudio surgió que en algunas bandas hay más de una especie molecular, como se observa en la Figura 5.4, panel inferior.

Se tomaron todos los péptidos N terminal de manera individual y se realizó una búsqueda en el genoma V1. Luego, con la secuencia encontrada para cada péptido se

realizó una nueva búsqueda por BLAST en las bases de datos públicas (UniProt) para tener un acercamiento a la identidad de cada proteína.

De acuerdo a lo esperado, la secuencia N-terminal de apo- P17 (con la que se contaba desde un principio) coincide con uno de los péptidos N-terminal de la banda P17A, puntualmente P17A1. A continuación se muestra el listado de péptidos que se usaron para la búsqueda en genoma V1:

P17A1: TTCNKPLLTAQMDKIHADAENGGEF

P17A2: GGMVAQEKSD

P17B: GAPVEHGTDDPRATS

El resultado con mejor score de la búsqueda en el genoma V1 de *D. renale*, con el péptido P17A1 fue la proteína g999.t1:

P17A1: TTCNKPLLTAQMDKIHADAENGGEF

>DREN_g999.t1

MLFPVLVFIAAISLASATTCNKPLLTAQMDKIHADAENGGEFYKLFFEMLPDVKKYFPEKFTTTAEV
AHMPFYQNQGKKFLTMLKKVVHDCDNEEALKHVDHELLKIHDEKKVPLEVVKTARPVVLKFLTEK
AGMSEEQKAAWKALRVQVEKLLEQEKHH

El resultado de la segunda ronda de búsqueda mediante BLAST usando UniProt como base de datos con la secuencia >DREN_g999.t1, se muestra en el siguiente cuadro:

ID Uniprot	Nombre de la proteína	% de identidad
A0A183J9P4	Contiene dominio de Globina (<i>Soboliphyme baturini</i>)	70.3%
A0A183IBE5	Contiene dominio de Globina (<i>Soboliphyme baturini</i>)	37.8%
A0A0V1DX64	Mioglobina (<i>Trichinella pseudospiralis</i>)	38.9%
A0A0V1GYK4	Mioglobina (<i>Trichinella zimbabwensis</i>)	38.4%
A0A0V1M6I1	Mioglobina (<i>Trichinella papuae</i>)	38.4%

El resultado de la primera ronda de búsqueda mediante BLAST con el péptido P17A2 en el genoma V1 de *D. renale* fue la proteína g31833.t1:

P17A2: **GGMVAQEKSD**

>g31833.t1

MLSLALLCLVFAANGQMMS**GGMVAQEKSD**PKAKSLACDALSVLNSQVAGGTLLRLVGIKSYST
QVVNGVIHKVEFYAAESACAAGTLHSLDCGLADPPVLKLCTVSSIERPWAPAEGRSGEGATCHDID
ASEGPSSLEVMQC

El resultado de la segunda ronda de búsqueda mediante BLAST con la secuencia

>g31833.t1 fue:

ID Uniprot	Nombre de la proteína	Organismo	% de identidad
A0A183I9U8	Contiene dominio de cistatina	<i>Soboliphyme baturini</i>	60%
A0A183IJP1	Contiene dominio de cistatina	<i>Soboliphyme baturini</i>	40.6%
A0A183IVC4	Contiene dominio de cistatina	<i>Soboliphyme baturini</i>	29.7%
A0A0V0WRI2	L-cistatina (fragmento)	<i>Trichinella sp. T6</i>	29.7%

El resultado de la búsqueda con el péptido B en el genoma draft de *D. renale* fue la proteína g31836.t1.

P17B: **GAPVEHGTDDPRATS**

>g31836.t1

MQRSELTSLKSNSAADQCQLTRDVNHETKRRSLNNRLSSLAASSGVTEFPVAVISVYLLLLASPLGQS
GRQRTSSAEWVLRQPVDGQNFDTSMSTPALQVSNVSAEGNANFSPKPHSELRYEQYCLVN
VVRVGYNRRSGQYSYQQQADVFFSSLPIPFQNHRSSTSKLTSPKSVQLTANDLNLHEVDXTKLTM
LVFACACIVLVASGQMMA**GAPVEHGTDDPRATS**LACDGLKVLRRKLTGGGEMQLVGKSFKTQV
VAGALSTVSFYVSETSCAAGSRCDSQPVLKLCTVSYIDRPWDPNPIPRGEGVKCQNVDPNAVPSKL
TVIKC

El resultado de la segunda ronda de búsqueda mediante BLAST con la secuencia >
g31836.t1 fue:

ID	Nombre de la proteína	Organismo	% de identidad
A0A183IJP1	Contiene dominio de cistatina	<i>Soboliphyme baturini</i>	53.6%
A0A183I9U8	Contiene dominio de cistatina	<i>Soboliphyme baturini</i>	48.8%

A0A183IVC4	Contiene dominio de cistatina	<i>Soboliphyme baturini</i>	31.8%
A0A183IT17	Contiene dominio de cistatina	<i>Soboliphyme baturini</i>	27%

El otro péptido surgido de la banda B (Figura 5.4) resulta muy inespecífico para la búsqueda y no revela resultados concretos.

En conclusión, de las especies moleculares analizadas encontramos que P17 corresponde a la proteína con N-terminal que coincide con P17A1, cuyo código en nuestra base de datos es DREN_g999.t1, y cuya secuencia tiene un alto porcentaje de identidad con globinas encontradas en el mismo clado, por lo que confirmamos su identidad como globina y obtuvimos su secuencia.

Secuencias que producen alineamientos significativos	Score (Bits)	E value
DREN_jg5692.t1 = DREN_g999.t1	326	1e-116
DREN_jg5691.t1 = DREN_g998.t1	155	3e-49
DREN_jg6113.t1	124	1e-35
DREN_jg6114.t1 = DREN_g1175.t1	120	2e-35
DREN_g1174.t1	116	1e-33
DREN_jg1272.t1 = DREN_g7721.t1	82.0	1e-20
DREN_jg7232.t1= DREN_g7750.t1	55.1	3e-10

Con dicha secuencia volvimos a hacer una búsqueda en el genoma V1 y como resultado obtuvimos la siguiente lista de proteínas candidatas:

De todas la nemglobinas las que tienen péptido señal son DREN_g999.t1, DREN_jg6114.t y DREN_g1174.t1.

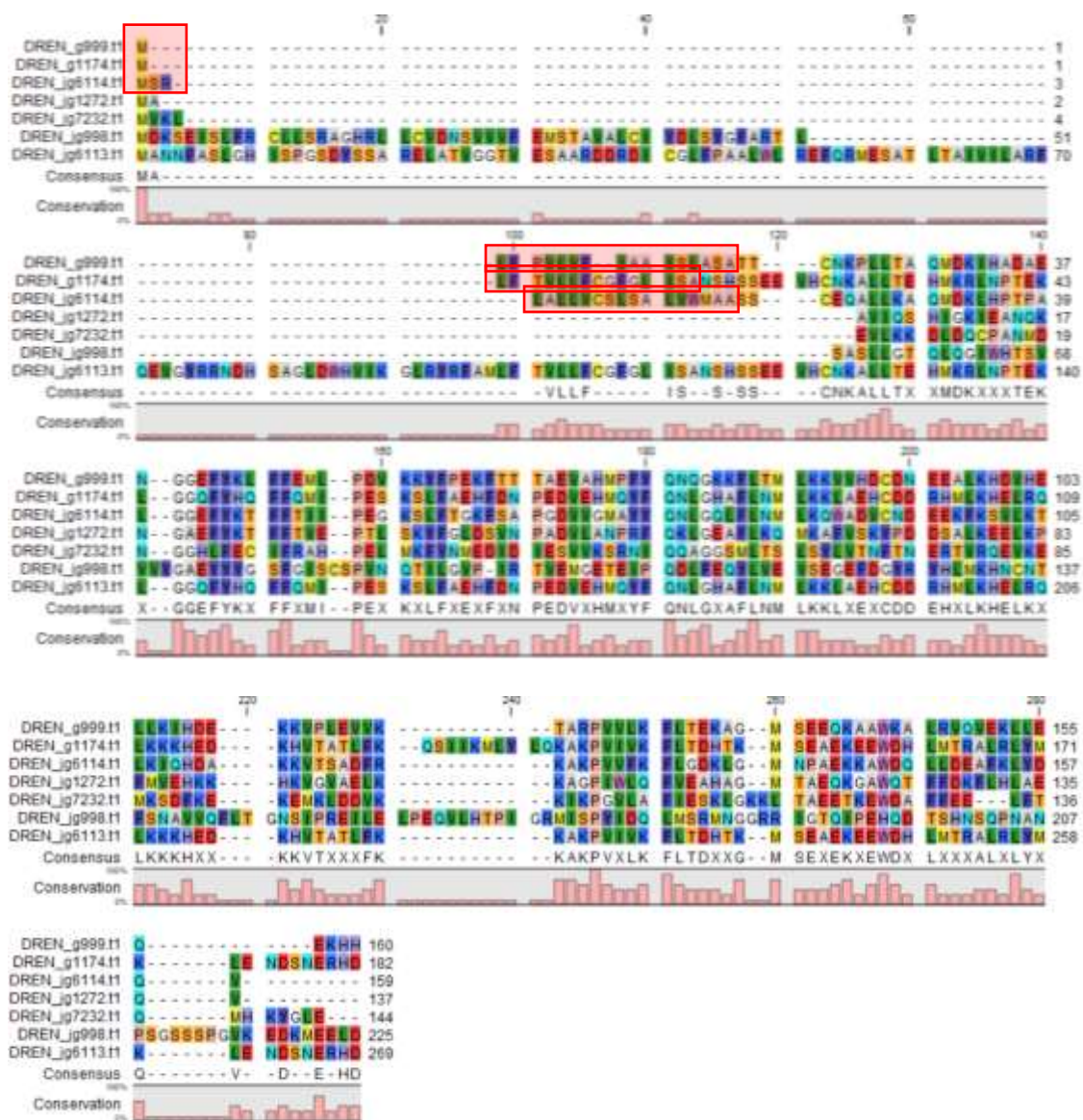


Figura 6.4: Alineamiento de secuencias relacionadas con P17, realizado con el programa CLC sequence viewer 8.0. Los parámetros utilizados fueron: Gap open cost =10, gap extensión cost =1, very accurate (slow).). En los rectángulos rojos de las proteínas >DREN_g1174.t1 y >DREN_jg6114.t1, se visualizan los péptidos señal encontrados mediante el servidor Signal-P 5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>)

4.4 Búsqueda del número de cromosomas de *D. renale*

Para realizar estos estudios se trabajó en colaboración con el Dr. Sergio Gustavo Rodríguez Gil, teniendo como lugar de trabajo el CEPAVE (Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores, CONICET-Universidad Nacional de La plata, Facultad de Ciencias Naturales y Museo). Los estudios citogenéticos de parásitos son útiles no sólo para comprender la sistemática, sino también los mecanismos básicos que subyacen a los agentes parasitarios. El estudio del cariotipo de *D. renale* (ver Apéndice 5) aporta información valiosa ya que no hay muchos cariotipos descritos para el clado I de este Phylum de animales. Por otro lado, la falta del conocimiento del número de cromosomas genera problemas para la investigación genómica ya que el genoma recién secuenciado debe ensamblarse y adjuntarse al mapa físico de un cromosoma (6). Como se relató anteriormente, se está trabajando para poder publicar el genoma de *D. renale* y los datos del número de cromosomas resultan muy útiles. En base a otros trabajos realizados en miembros del clado I sabemos que el cariotipo de *Trichuris globulosa*, *T. muris*, *T. myocastoris*, *T. ovis*, *T. suis* y *T. syl vilagi* es $2n=6$ (7). Thomas (1965) estableció que el número de cromosomas de *T. spiralis* es $2n=6$ (8). Mas tarde, varios investigadores reportaron exactamente el mismo número de cromosomas ($2n=6$ para las hembras, $2n=5$ para los machos) reforzando lo informado por Thomas, (Geller et al. (1972) (9), Geller y Gridasova (1974) (10) compararon los cariotipos de *T. spiralis* y *T. nativa*, Penkova y Romanenko (1973), estudiaron el cariotipo de *T. spiralis*, *T. nativa* y *T. pseudospiralis* (11). Mutafova y Komandarev (1976) el de *T. nelsoni* (12).

Con los resultados obtenidos hasta ahora se puede concluir que *D. renale* presenta un número de cromosomas de $2n=6$ (como se observa en la Figura 9.4, en la cual observamos el $2n$ luego de la primera división mitótica) como el resto de los nematodos del mismo clado para los cuales se encuentra la información disponible. Si bien falta profundizar el análisis, con las imágenes obtenidas hasta ahora a partir de huevos de *D. renale* las conclusiones sobre el número de cromosomas son muy robustas.

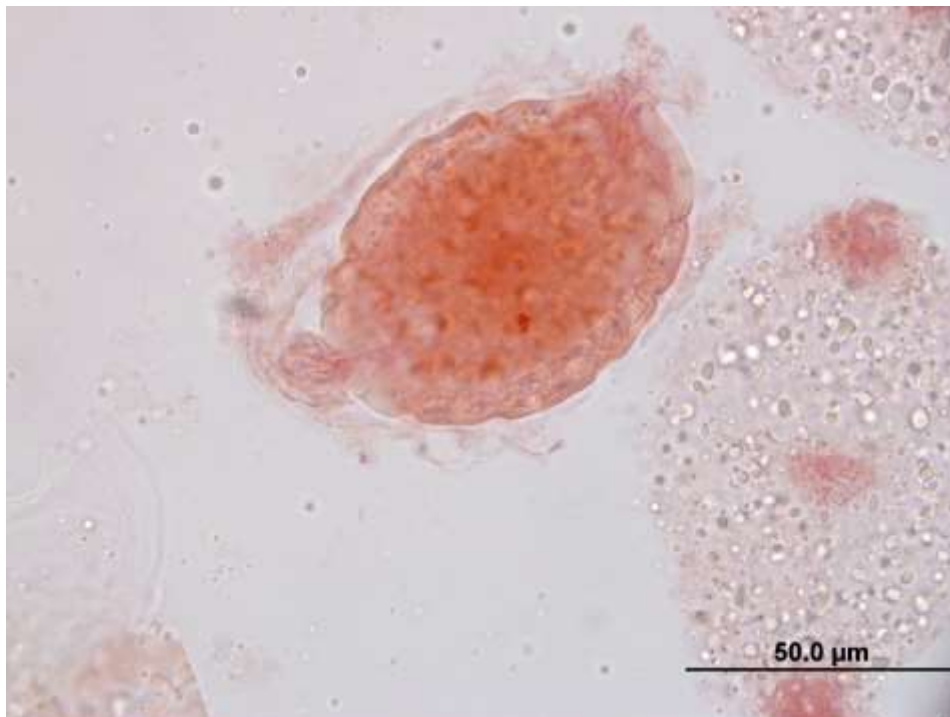


Figura 7.4: En la figura se observa un huevo de *D. renale* en meiosis arrestada en metafase 1, se observa un $n=3$, 100x.

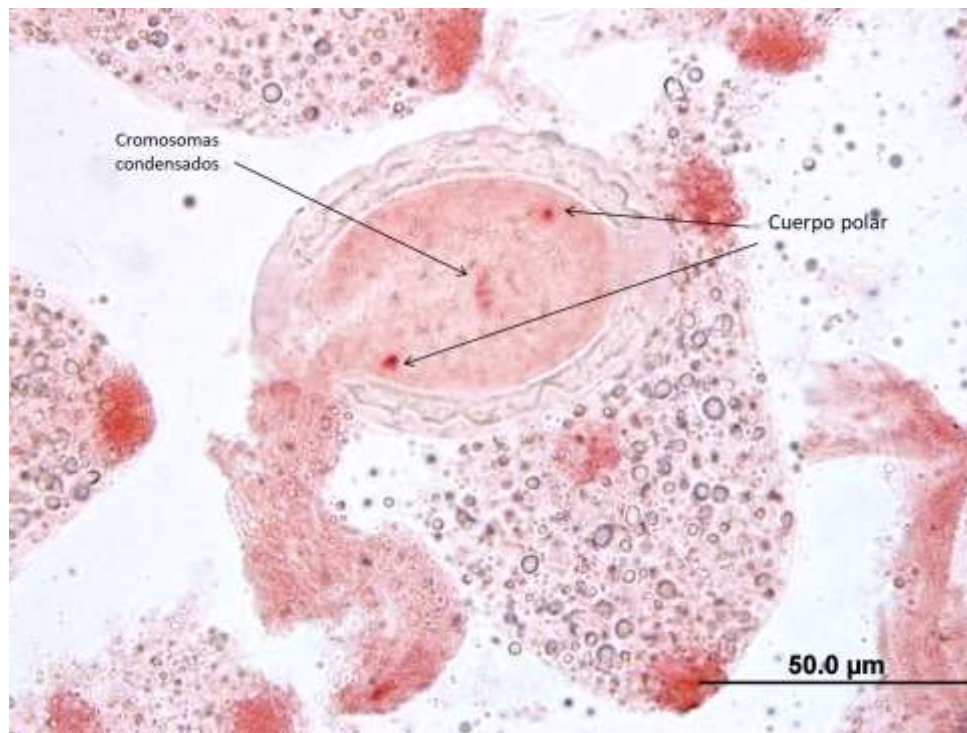


Figura 8.4: En la figura se observa un huevo de *D. renale* metafase mitótica. Se observan tres cromosomas, 100x.

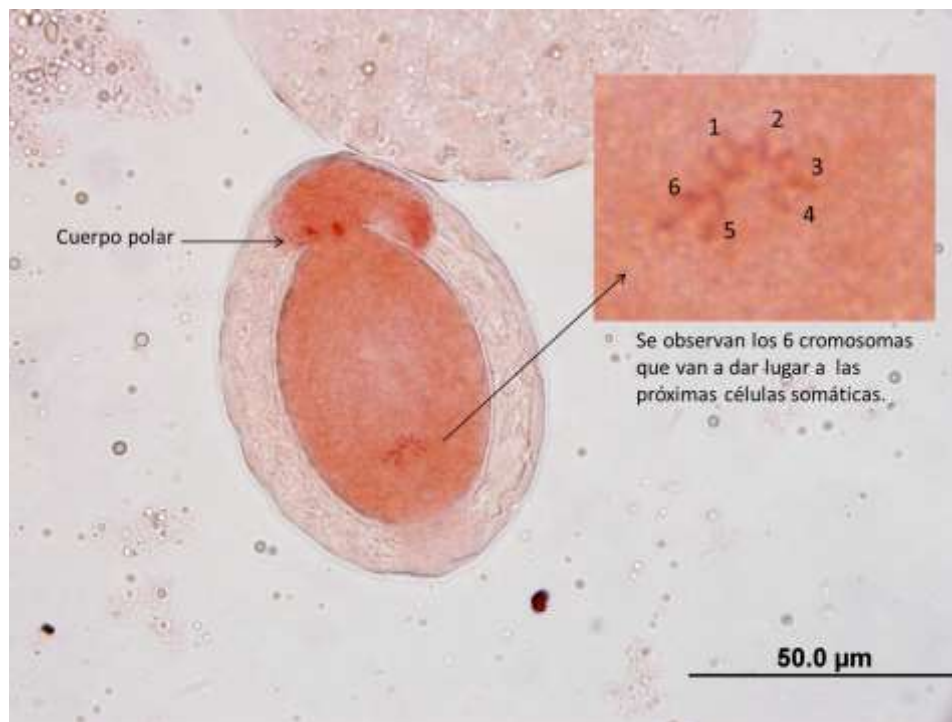


Figura 9.4: Célula ya fecundada entrando en la primera división mitótica, se observan $2n=6$, 100x.

4.5 Obtención del proteoma de *D. renale*

Como ya se planteó anteriormente es indiscutible la necesidad de datos experimentales que nos permitan profundizar el estudio que se viene realizando hasta ahora. Poder conocer que proteínas expresa este nematode aporta información de alto valor, muy difícil de obtener, no solo para los nematodes del clado, sino pensando en todos los nematodes que existen, ya que el tamaño de *D. renale* nos permite hacer un estudio proteómico diferenciando por tejido y de esta forma se adquieren perfiles de expresión mucho más específicos. Como estrategia experimental, para poder realizar dicho estudio se planteó un análisis mediante espectrometría de masas realizado en el Centro de Estudios Químicos y Biológicos en Espectrometría de Masa (CEQUIBIEM, CONICET, UBA) (ver Apéndice 6).

De la misma manera que procedimos con los datos del genoma V1, una de las primeras búsquedas realizadas en el proteoma obtenido fueron las secuencias correspondientes a P44 y P17. Ambas proteínas fueron encontradas en lo datos con excelentes scores. Ambas presentan más de un péptido único de nivel de confianza alta (Figuras 10.4 y 11.4), lo cual da mucha robustez al resultado. A partir de este resultado surgió la necesidad de hacer estudios más extensos, para los cuales recurrimos al uso de diferentes softwares, que nos permitieron encontrar muchas respuestas a preguntas planteadas anteriormente.

DREN_g2533.t1

Confidence	Sequence
High	SCGKDEHCPTCGDVCTLK
High	RSCGKDEHCPTCGDVCTLK
High	SCGKDEHCPTCGDVCTLKK
High	MATDLEKYCDVDYK
High	MATDLEKYCDVDYK
High	VEHACGIETHR
High	TRPAKDGCFFAETESK
High	TEWSQCLWFPLSKMATDLEK
High	TEWSQCLWFPLSK
High	CCCHPYHPNEDGTK
High	CCCGGYPNLDGTQCYK
High	DGCFPAETESK
High	FGCHWQVYKEAIR
High	DEHCPTCGDVCTLK
High	VCHEFKDVCTLTTPHK
High	EGYADILK

Figura 10.4: Resultado de estudios proteómicos del tejido LPC. En la tabla se observa la secuencia de los péptidos que dan hits para P44 (g2533.t1, código en el genoma V1 de *D. renale*)

DREN_g999.t1

Confidence	Sequence
High	IHDEKKVPLEVVK
High	IHADAENGGEFYKFFEMLPDL
High	IHADAENGGEFYKFFEMLPDL
High	IHADAENGGEFYKFFEMLPDL
High	IHADAENGGEFYK
High	VQVEKLLEGEKHH
High	VQVEKLLEGEK
High	VPLEVVKTARPVVLK
High	VVHDCDNEEALK
High	VVHDCDNEEALKHDVHELLK
High	YFPEKFTTTAEVAHMPFYQNGQ
High	TARPVVLKFLTEK
High	IHADAENGGEFYKFFEMLPDL
High	FTTTAEVAHMPFYQNGGK
High	FTTTAEVAHMPFYQNGGK
High	ALRVQVEKLLEGEK
High	FTTTAEVAHMPFYQNGGKK
High	FTTTAEVAHMPFYQNGGKK
High	KVVHDCDNEEALKHDVHELLK
High	KVVHDCDNEEALK
High	KVPLEVVK
High	KFLTMLK
High	LFFEMLPDVKK
High	LFFEMLPDVKK
High	LFFEMLPDVK
High	LFFEMLPDVK
High	KFLTMLK
High	HDVHELLK
High	KFLTMLKK
High	LLEGEKHH
High	KYFPEK

Figura 11.4 Resultado de estudios proteómicos del tejido LPC. En la tabla se observa la secuencia de los péptidos que dan hits para P17 (g999.t1) código en el genoma V1 de *D. renale*).

4.6 Análisis de los datos proteómicos

4.6.1 Análisis de los datos proteómicos usando MaxQuant 2.0.3.1.

MaxQuant es un paquete de software para proteómica, diseñado para analizar grandes conjuntos de datos de espectrometría de masas (13). Está específicamente dirigido a datos de MS (MS = Mass spectroscopy) de alta resolución. MaxQuant está disponible gratuitamente; la descarga incluye el motor de búsqueda Andrómeda, que está integrado en MaxQuant, así como la aplicación de visualización para la inspección de datos en bruto y la identificación y cuantificación de resultados. Para el análisis estadístico de la salida de MaxQuant, usamos el software Perseus (14). Como base de datos para el análisis utilizamos nuestra predicción de proteínas V1 de *D. renale*; los parámetros para el análisis por MaxQuant se mantuvieron los determinados por defecto por el software salvo en la opción de modificaciones donde deshabilitamos la opción acetilación además de trabajar con un FDR de 0.03 (FDR: tasas de falsos descubrimientos (del inglés, false discovery rate)).

Los primeros datos obtenidos a partir de este estudio proteómico nos proporcionaron una visión global de los resultados, incluyendo el número total de proteínas identificadas, la cobertura de vías específicas y grupos de proteínas. Una buena práctica en el análisis de datos es comenzar con estadísticas exploratorias para comprobar si hay sesgos en los datos, valores atípicos no deseados y experimentos con datos de baja

calidad, así nos aseguramos de que se cumplan todos los requisitos para realizar las pruebas estadísticas posteriores. Una vez que los datos de las tres hembras y los tres machos de *D. renale*, se filtraron y normalizaron adecuadamente, se realizaron análisis estadísticos y bioinformáticos para identificar proteínas que probablemente sean funcionalmente importantes (ver Apéndice 6).

Como resultado de diferentes filtros aplicados a los datos, facilitados por Perseus, contamos con 1873 proteínas totales, confiables para realizar el análisis. En la Figura 12.4 figuran la cantidad de proteínas encontradas en cada tejido.

Muestra Esófagos	Total
E1m	990
E2m	1006
E3m	991
E4h	988
E5h	1051
E6h	1056

Muestra Digestivo	total
D1m	897
D2m	1020
D3m	963
D4h	983
D5h	827
D6h	483

Muestra Gónada	Total
G1m	887
G2m	903
G3m	1361
G4h	967
G5h	1005
G6h	870

Muestra LPC	total
LPC2m	227
LPC3m	251
LPC4h	298
LPC5h	252
LPC6h	287

Muestra Pared Corporal	total
PC1m	813
PC2m	754
PC3m	977
PC4h	884
PC5h	914
PC6h	867

Figura 12.4: Cantidad de proteínas por tejido y por muestra. PC: pared corporal, D: tejido digestivo, E: esófago, G: gónada, LPC: liquido pseudocelómico, m: macho y h: hembra.

Como control de calidad experimental se realizó una visualización de los resultados mediante gráficos de dispersión múltiple (Figura 13.4), y así, al comparar tejidos iguales o diferentes se pudo observar cómo cambia la correlación de las proteínas que componen cada tejido. Este tipo de análisis otorga una idea de cuan confiables son las réplicas obtenidas para cada tejido además de brindar una primera visualización integral de los datos. Por ejemplo, si las proteínas que componen un tejido dado difieren mucho entre los diferentes sexos, se puede observar muy fácilmente un determinado patrón de dispersión.

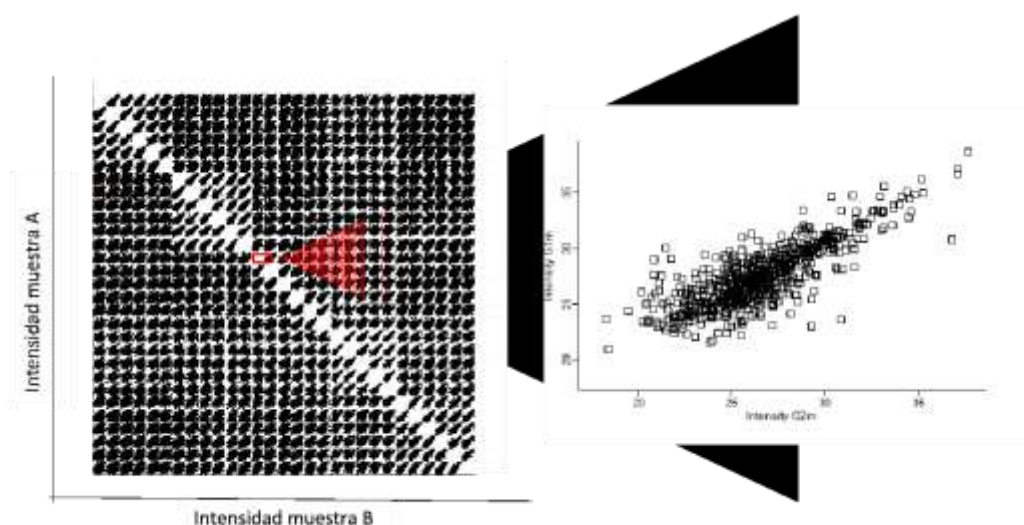


Figura 13.4: Gráficos de dispersión múltiple. Este gráfico compara las intensidades de todas las muestras entre sí, cada nube de puntos corresponde a las proteínas que comparten dos diferentes muestras. En la figura se puede observar ampliado uno de los gráficos de dispersión resultado de comparar dos gónadas de machos diferentes, donde la muestra A sería Gm1 y la B sería Gm2.

Para cada diagrama de dispersión se calculó la correlación de Pearson obteniéndose así un indicativo del grado de correlación. De esta manera, visualizamos y corroboramos numéricamente qué muestras son más similares entre sí. La mejor correlación se dio

entre LPC3m y LPC2m con un valor de 0.9059 (Figura 14.4) y la menor correlación se dio entre LPC3m y E1m con un valor de -0.0965 (Figura 15.4). En la figura 16.4, donde se comparan gónadas del gusano numero 3 macho vs el gusano número 4 hembra, podemos ver un ejemplo del grado de dispersión para un mismo tejido, pero de diferentes sexos, con una correlación de Pearson de 0.6648. Este valor bajo podría considerarse un indicativo de diferencias en el perfil proteómico determinadas por el sexo y por ende resulta interesante evaluar.

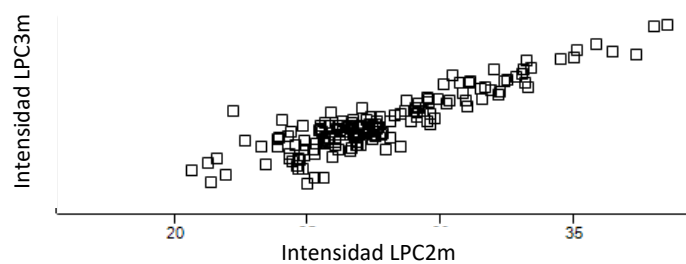


Figura 14.4: Gráfico de dispersión que presenta la mejor correlación de todas nuestras muestras. En este caso se da entre LPC3m y LPC2m. Cada punto corresponde a la intensidad de una misma proteína en cada tejido. Correlación de Pearson de 0.9059.

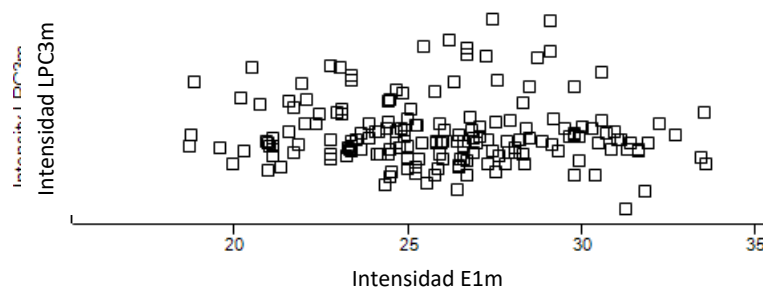


Figura 15.4: Gráfico de dispersión que presenta la correlación más baja de todas nuestras muestras. En este caso se da entre LPC3m y E1m. correlación de Pearson de -0.0965

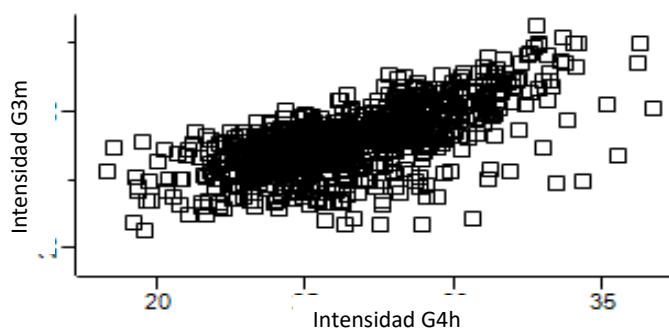


Figura 16.4: Grafico de dispersión que presenta la correlación de dos muestras de un mismo tejido, pero de diferentes sexos, en este caso la gónada de macho versus la de hembra. correlación de Pearson de 0.6648.

Por otro lado, mediante el programa Perseus, también pudimos elaborar histogramas (Figura 17.4) para cada una de las muestras.

Observando los histogramas, accedemos a las distribuciones normales de cada muestra y así podemos obtener una visualización, que permite evaluar si las distribuciones de proporción general son similares para todas las muestras o si la distribución es peculiar de alguna manera, y de esta forma también evaluar si confiamos o descartamos alguna muestra. Sí bien para cada replica de un mismo tejido esperamos que la distribución sea aproximada, son varios los factores que podrían influir en la intensidad de una proteína, de todas formas, se esperaría que entre las muestras de un mismo tejido se dé una distribución normal aproximada. Finalmente, en la Figura 17.4 podemos ver de forma bastante inmediata como el patrón de las muestras tiene una distribución normal y que las distribuciones de proporciones generales son lo suficientemente similares para todas las muestras de un mismo tejido.

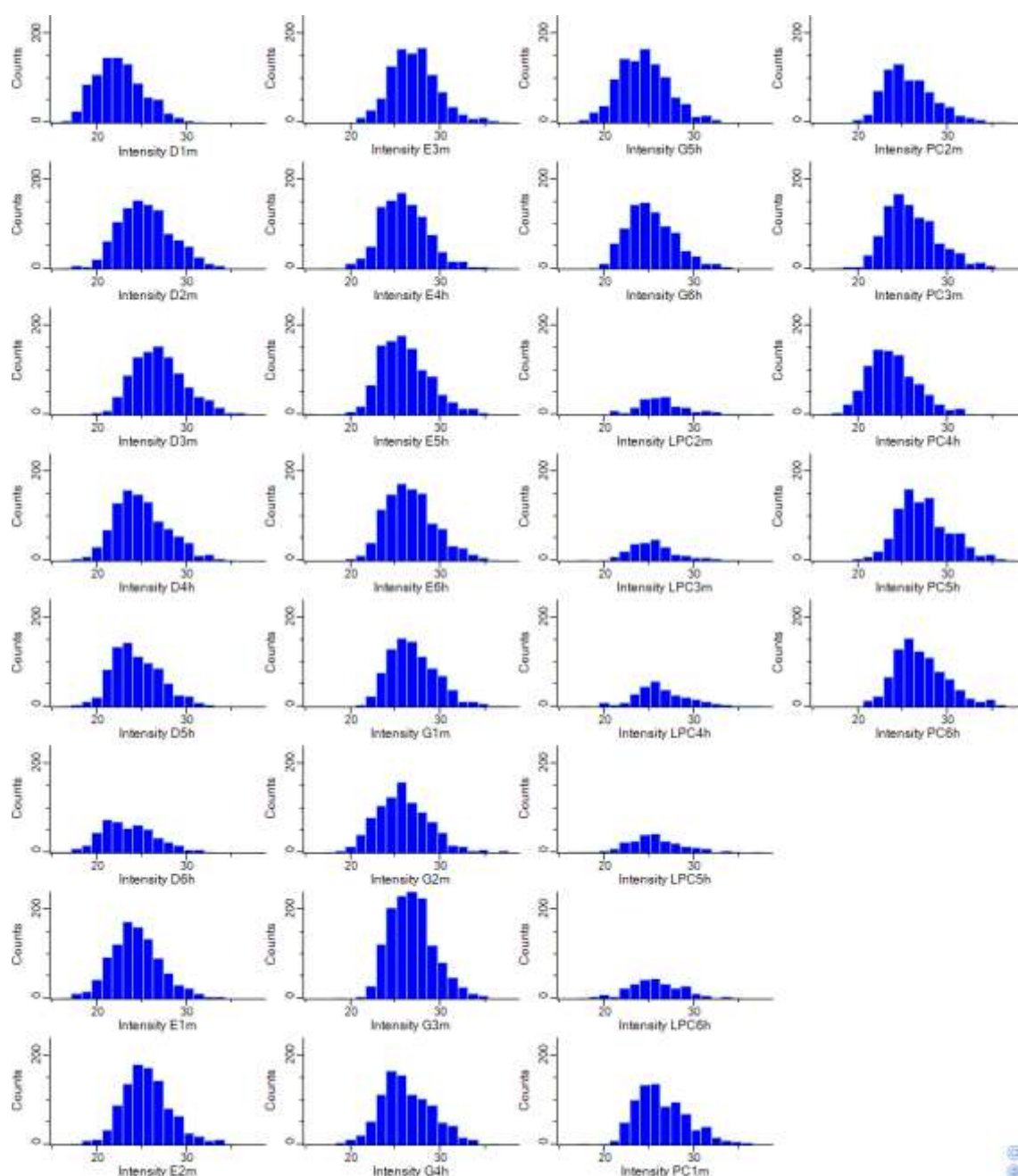


Figura 17.4: Histogramas mostrando la distribución de intensidades de las proteínas para cada uno de los tejidos.

En resumen, podemos concluir que nuestras replicas para los distintos tejidos analizados son confiables. Los perfiles que muestran los gráficos de distribución presentaban un índice de correlación de Pearson alto para muestras de un mismo tejido, y, además, los

histogramas muestran una distribución normal de las intensidades y son similares cuando miramos diferentes muestras, pero de un mismo tejido.

4.6.2 Análisis del comportamiento de las familias de proteínas P44 y P17 mediante gráficos de perfiles.

Una de las herramientas que brinda Perseus es la posibilidad de realizar gráficos de perfiles de proteínas. Básicamente, podemos visualizar el perfil de las diferentes intensidades de cada proteína en cada tejido y sus réplicas tanto en macho como hembra. Tomamos esta herramienta para visualizar que sucedía con las familias de proteínas encontradas para P44 (Figura 18.4) y para P17 (Figura 19.4).

Para el caso de P44, usando como base de datos nuestro proteoma surgido *in silico* a partir del genoma V1 de *D. renale* encontramos cinco proteínas que consideramos forman parte de la familia de P44. De estas cinco proteínas solo encontramos dos en nuestros datos filtrados mediante Perseus: [DREN_jg2306.t1](#) / [DREN_g2533.t1](#) color violeta y [DREN_jg2277.t1](#) / [DREN_g2512.t1](#) color azul, ver Figura 15.4.

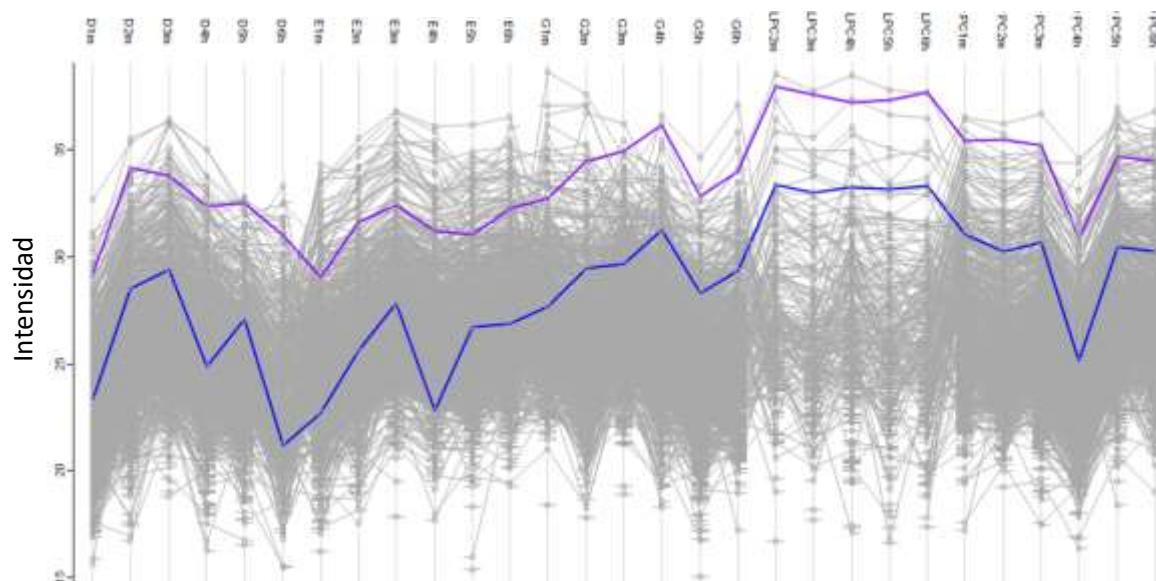
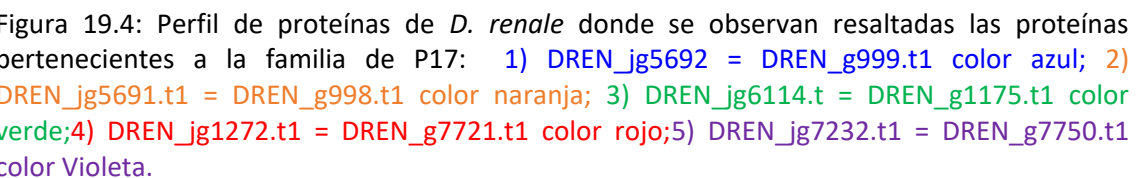


Figura 18.4: Perfil de proteínas de *D. renale* presentes en los distintos y ejemplares donde se observan resaltadas dos de las proteínas pertenecientes a la familia de P44: [DREN_jg2306.t1 / DREN_g2533.t1](#) color violeta y [DREN_jg2277.t1 / DREN_g2512.t1](#) color azul.

En la Figura 18.4 se puede observar que ambas proteínas se encuentran presentes en todos los tejidos y ejemplares, y si bien [DREN_jg2306.t1 / DREN_g2533.t1](#) presenta mayor intensidad, ambas presentan perfiles parecidos en los cuales la mayor intensidad se ve en las muestras de LPC, sin distinción de sexo.

Con respecto a las proteínas encontradas como parte de la familia de P17, de las siete que surgieron luego de la búsqueda en la predicción de proteínas, encontramos cinco en este análisis proteómico (Figura 19.4).



99

Si bien faltan estudios para poder evaluar posibles localizaciones por tejidos este resultado nos arroja un buen punto de partida. A grandes rasgos dichas nemoglobinas se presentan con mayor abundancia en LPC y pared corporal. Estos distintos patrones de distribución podrían denotar funciones diferenciales para cada uno de los miembros de la familia de P17.

4.6.3 Patrones diferenciales entre tejidos.

Mediante el uso de gráficos de dispersión o “volcano plots” se realizaron comparaciones entre los distintos tejidos. En primera instancia, se graficaron y compararon proteínas compartidas por todas las muestras para observar si existían diferencias de intensidad dependiendo del sexo. De esta manera, obtuvimos el gráfico que se observa en la Figura 20.4. En el mismo se pueden observar, diferentes cuadrantes, que ayudan a visualizar que proteínas resultan con una diferencia significativa de intensidad para cada sexo. En el cuadrante superior izquierdo se encuentran las proteínas que presentan menor intensidad (color verde) y en el derecho los que presentan mayor intensidad (color rosa) en los tejidos de ejemplares machos de *D. renale* en comparación con ejemplares hembra y viceversa. Los ID de las proteínas figuran debajo del gráfico, así como los hits que dieron cuando se realizó una búsqueda de tipo BLAST-p usando como base de datos Uniprot.

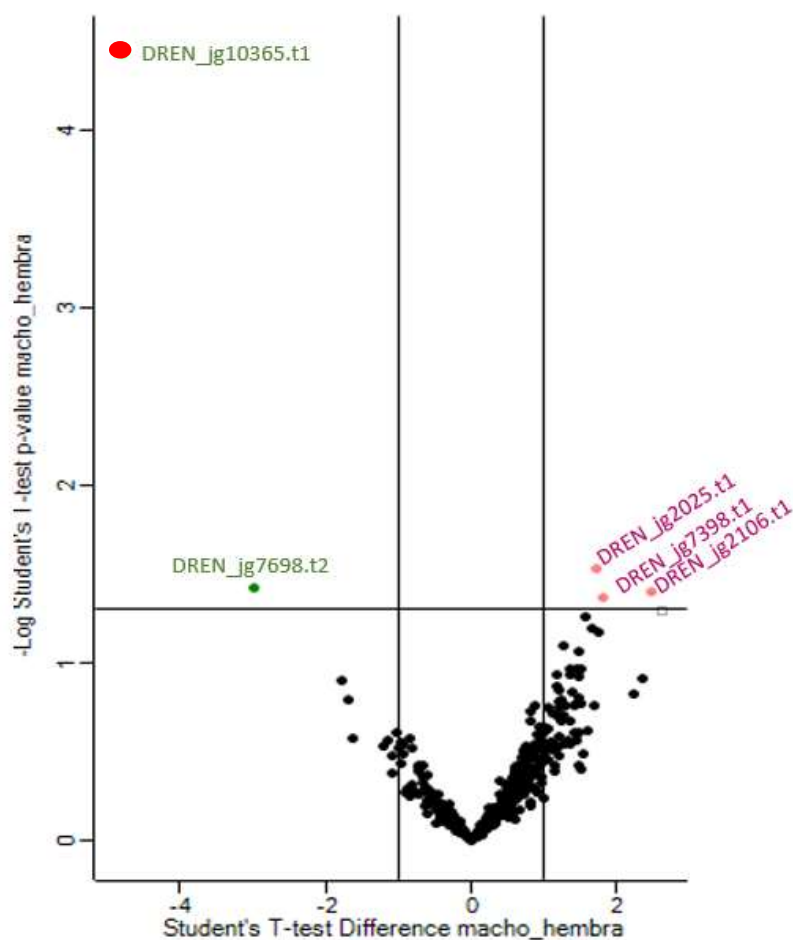


Figura 20.4: Gráfico de dispersión donde comparamos las proteínas presentes en todos los tejidos de *D. renale* macho con respecto a las de hembra.

DREN_jg2106.t1: A0A183J098_9BILAVitelogenina *Soboliphyme baturini*.

DREN_jg7398.t1: A0A2G9UFD6_TELCICopina *Teladorsagia circumcincta*

DREN_jg2025.t1: A7RM33_NEMVEGlloxilasa contiene dominio 4 *Nemaostella Vectensis*

DREN_jg7698.t2: A0A3R7SKD3_PENVAPutativa DNA-directo RNA polimerasa II subunidad RPB1-like isoforma 1 *Penaeus vannamei*.

DREN_jg10365.t1: A0A183I8R0_9BILAVitelogenina contiene dominio *Soboliphyme baturini*

También resultó interesante estudiar la distribución de las muestras cuando las agrupamos según sexo y tejido, de esta forma se compararon, por ejemplo, gónadas de machos contra gónadas de hembras teniendo triplicados para cada tejido (Figura 21.4). Realizando esta comparación específica de tejido, el número de proteínas que resultan con una diferencia significativa aumenta. Tomando estos nuevos resultados y

observando la Figura 21.4 resultado de interés la proteína **DREN_jg10365.t1**. Cuando la misma es utilizada como carnada en un BLAST-P contra proteínas de nematodos de la base de datos Uniprot, surge como mejor resultado la proteína A0A183I8R0_9BILA (Vitellogenin domain-containing protein OS=Soboliphyme baturini OX=241478 GN=SBAD_LOCUS3 PE=4 SV=1)

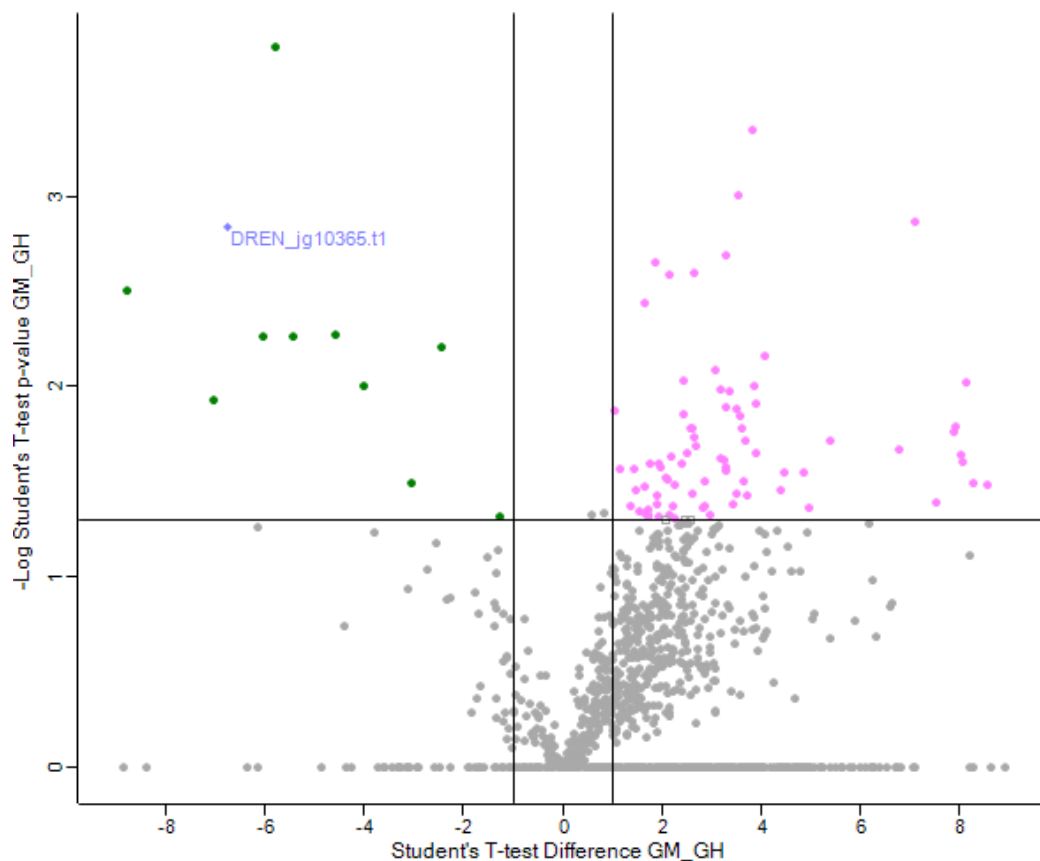


Figura 18.4: Gráfico de dispersión donde se compara de manera tejido específica gónadas de macho de *D. renale* con respecto a las de hembra. Podemos observar la proteína DREN_jg10365.t1 que es identificada como vitelogenina. Ver lista anexa 1.

DREN_jg10365.t1 fue seleccionada en parte porque aparece en ambos tipos de comparaciones (general y tejido específico) y en la descripción de su posible ortóloga **A0A183I8R0_9BILA** se establece que sería una vitelogenina. Las proteínas que

pertenecen a la familia de las vitelogeninas, tienen como función la de actuar como precursor de las proteínas de la yema de huevo que son fuente de nutrientes durante el desarrollo embrionario, además de presentar actividad como transportador de lípidos y reservorio de nutrientes. La proteína vitelogenina (VTG), es una importante lipoproteína en muchos animales ovíparos, es un precursor de un producto de unión a lípidos llamado lipovitelina. La lipovitelina es el principal complejo lípido-proteína que se encuentra en la yema de los animales que ponen huevos y está involucrada en el almacenamiento de lípidos y metales. En el extremo N-terminal, contiene una secuencia de aproximadamente 670 aminoácidos (cadena LV1n), que también se conserva en otras lipoproteínas grandes, como la proteína microsomal de transferencia de triglicéridos (MTP) y la apolipoproteína B-100 (apo B) (15–17) el hecho de que su nivel de expresión sea mayor en las hembras puede deberse a que se encuentra asociada a la formación de los huevos de *D. renale*.

4.6.4 Estudio de clusters de proteínas.

Perseus permite el armado de un mapa de calor, en donde las intensidades de las proteínas son representadas con colores como se muestra en la escala de la Figura 22.4, y a su vez, las agrupa en grupos o “clusters” según diferentes características como el número de péptidos totales, el número de péptidos únicos y el score. De esta forma se puede ver que proteínas presentan mayor intensidad en cada tejido y estudiar si existen proteínas que se comporten de forma similar a diferentes proteínas de interés.

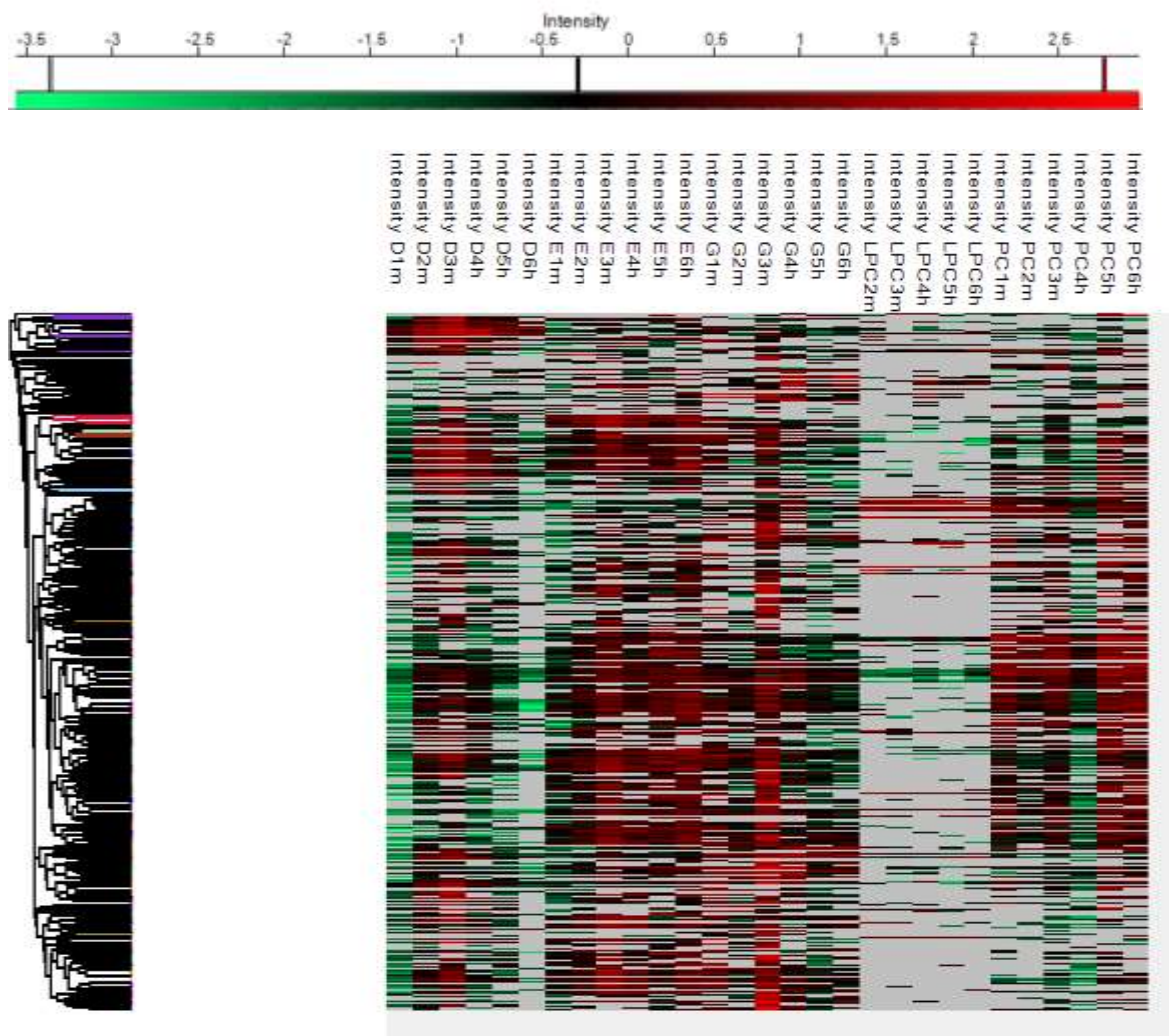


Figura 22.4: Mapa de calor construido incluyendo todos los tejidos y ejemplares. Los colores representan intensidades comparativas de los niveles de proteína en una escala de intensidad, de -3.5 a 3, que van desde el verde (baja intensidad) hasta el rojo (alta intensidad) pasando por el negro, como se indica en la regla. Las barras grises indican que no se detectó la proteína.

Si se amplía el grafico podemos ver los ID de las proteínas que contiene cada cluster como se muestra en la Figura 23.4, donde está señalado con verde un grupo de proteínas entre las cuales se encuentran algunas nemoglobinas del nematode, la mayoría son parte de la familia de globinas relacionadas con P17.

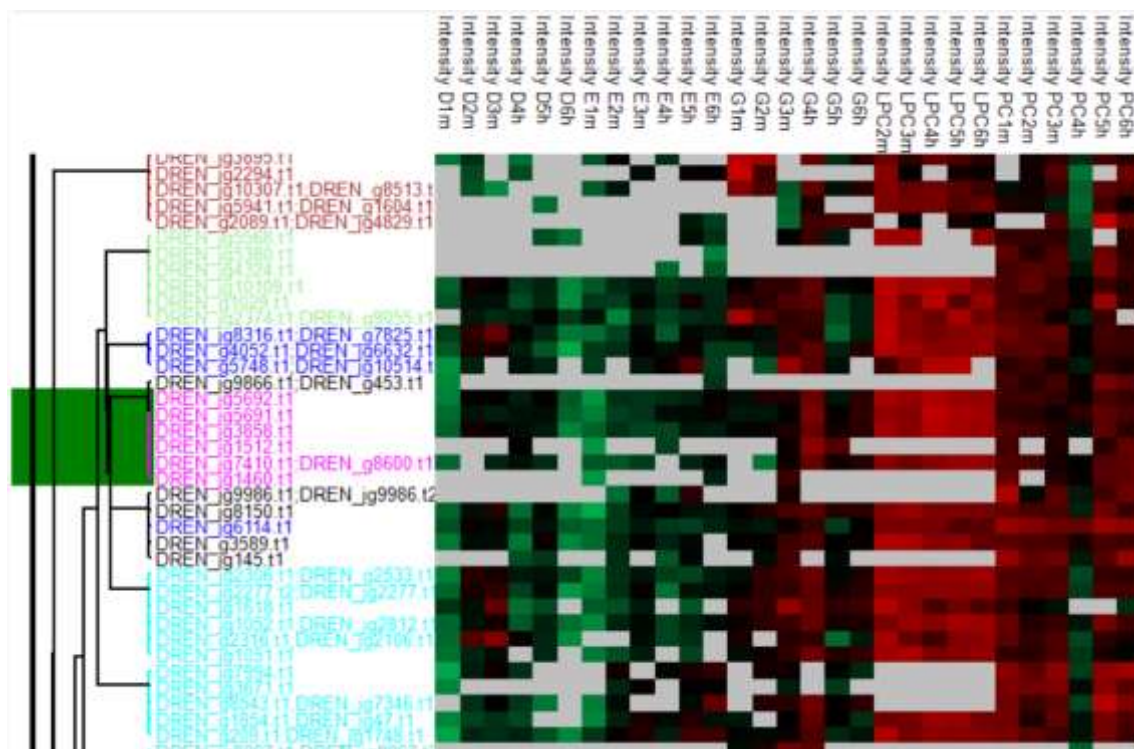


Figura 23.4: Ampliación de un sector del mapa de calor general. En verde (texto en rosa) se señala el cluster, donde se agrupan diferentes nemoglobinas de *D. renale*, las mismas presentan mayor intensidad en el LPC.

Estos resultados coinciden a lo observado cuando se analizaron de forma específica las intensidades de las proteínas relacionadas con P17 en las distintas muestras (Figura 19.4). Asimismo, estos mismos pueden ser visualizados con gráficos de distribución del tipo volcano plot.

A continuación, con el objetivo de profundizar la búsqueda de proteínas que resulten interesantes para posibles blancos de acción, se centró el estudio y la comparación de las proteínas presentes en los tejidos de esófago, digestivo y líquido pseudocelómico. Por varios antecedentes nombrados anteriormente sabemos que en dichos tejidos pueden existir proteínas que queden expuestas a la interacción con el hospedador y por ende puedan generar respuestas de distinto tipo. Entonces se enfrentaron digestivo vs

esófago (Figura 24.4) y LPC vs esófago (Figura 25.4). Las listas de proteínas resultantes que fueron de mayor interés se encuentran debajo de los respectivos gráficos. El criterio para considerar proteínas de mayor interés deviene de los análisis que hemos estado realizando anteriormente, en particular buscamos globinas y proteínas de unión a lípidos debido a que nuestra hipótesis es que resultan fundamentales para la vida del nematode, lo que las presenta como posibles blancos terapéuticos. El resto de las proteínas de la lista se puede visualizar en tabla anexa 1.

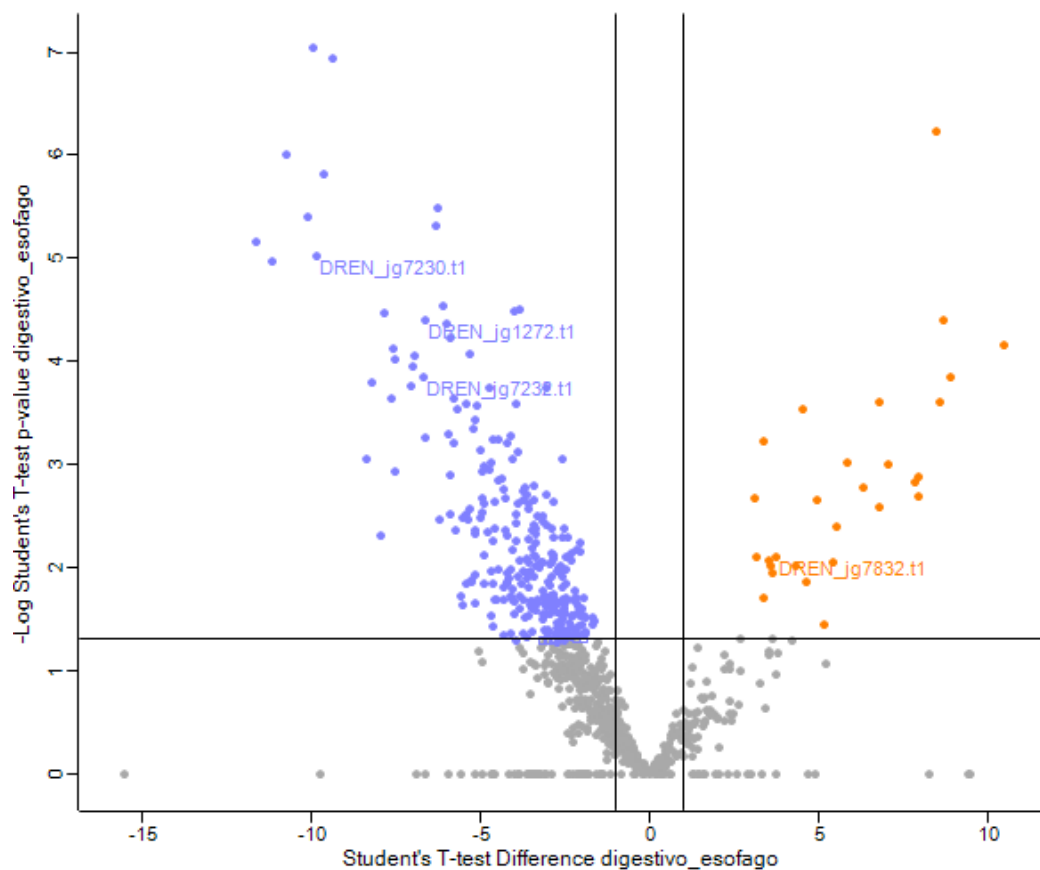


Figura 24.4: Gráfico de dispersión donde se comparan tejido digestivo de *D. renale* con respecto al esófago de *D. renale*.

- DREN_jg7832.t1 unión a lípidos -IEA

- DREN_jg1272.t1 unión de oxígeno -IEA; transportador de oxígeno-IEA; unión de hemo-IEA; actividad de transportador de oxígeno-IEA
- DREN_jg7232.t1 unión de oxígeno -IEA; transportador de oxígeno-IEA; unión de hemo-IEA; actividad de transportador de oxígeno-IEA
- DREN_jg7230.t1 espacio extracelular-IBA; actividad de peptidasa-IEA; proteólisis-IEA; regulación de actividad catalítica-IEA; tipo cisteína actividad de endopeptidasa-IEA; proteólisis en procesos celulares catabólicos -IBA; lisosoma-IEA; lisosoma -IBA; apical plasma membrana-IEA; hidrolasa-IEA

En el cuadrante superior izquierdo de la Figura 24.4 se encuentran las proteínas que presentan menor intensidad (color violeta) y en el derecho los que presentan mayor intensidad (color naranja) para el tubo digestivo de *D. renale*; resulta a la inversa para el esófago de *D. renale*. Podemos observar, que de las proteínas que nos resultaron interesantes como posibles blancos de acción tenemos transportadores lipídicos, mayoritario en tubo digestivo y un transportador de oxígeno, más una peptidasa mayoritaria en esófago, resultados que concuerdan con las funciones que sabemos que tienen dichos tejidos.

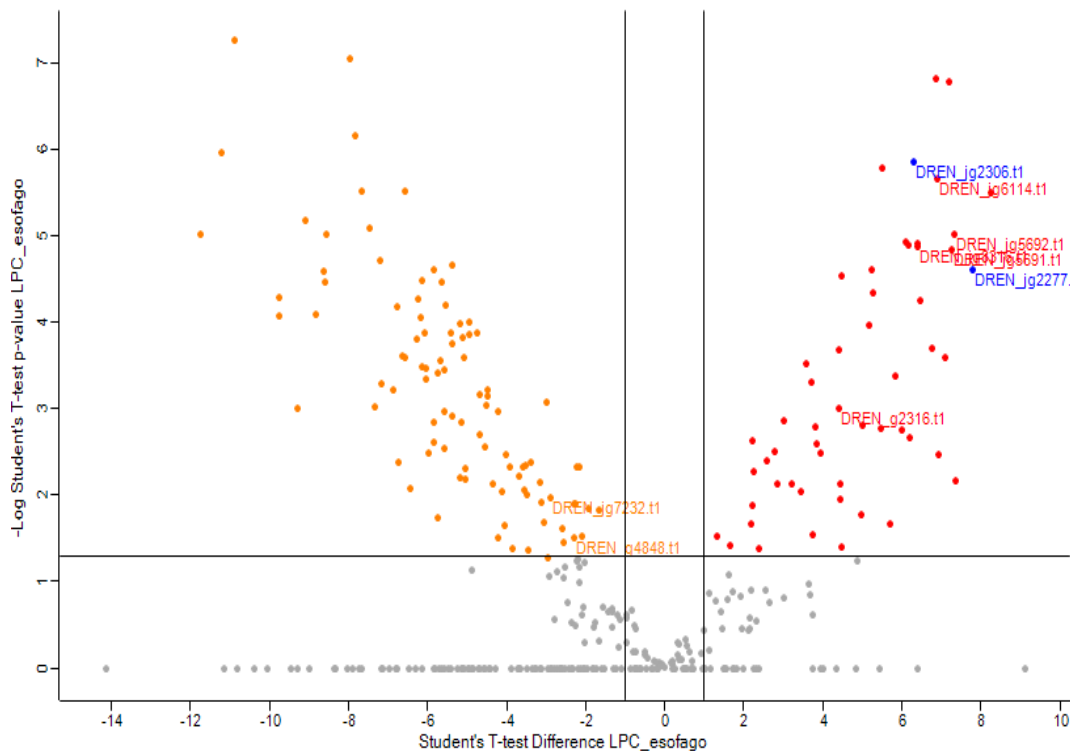


Figura 25.4. Gráfico de dispersión donde se comparan LPC de *D. renale* con respecto al esófago de *D. renale*. En azul puedo observar a dos proteínas de la familia de P44.

- DREN_jg6114.t1 unión a oxígeno -IEA; transportador de oxígeno -IEA; unión a hemo-IEA; actividad de unión a hemo-IEA
- DREN_jg5692.t1 unión de oxígeno -IEA; transportador de oxígeno-IEA; unión de hemo-IEA; actividad de transportador de oxígeno-IEA
- DREN_jg5691.t1 unión de oxígeno -IEA; transportador de oxígeno-IEA; unión de hemo-IEA; actividad de transportador de oxígeno-IEA
- DREN_jg8316.t1 transportador lipídico-IEA; actividad como transportador lipídico -IEA; actividad como reservorio de nutrientes -IEA
- DREN_g2316.t1 transportador lipídico-IEA; actividad como transportador lipídico-IEA; membrana-IEA; componente integral de membrana-IEA; proteína con actividad de quinasa-IEA; unión a ATP -IEA; actividad como reservorio de nutrientes -IEA; fosforilación -IEA.
- DREN_jg7232.t1 unión de oxígeno -IEA; transportador de oxígeno-IEA; unión de hemo-IEA; actividad de transportador de oxígeno-IEA
- DREN_g4848.t1 unión de iones metálicos -IEA; membrana-IEA; componente integral de membrana IEA; unión a hemo -IEA; región perinuclear de citoplasma IEA

En el cuadrante superior izquierdo de la Figura 25.4, se encuentran las proteínas que presentan menor intensidad (color naranja) y en el derecho los que presentan mayor intensidad (color rojo) en LPC; resulta a la inversa para esófago. Al analizar la Figura 25.4 observamos que, al comparar LPC con esófago, para este último podemos encontrar la proteína DREN_jg7232.t1 que se trata de una proteína que contiene un grupo hemo y transporta oxígeno. Esta proteína, también resulta más intensa en el esófago, cuando lo enfrentamos al tejido digestivo (Figura 24.4), como vimos anteriormente. Todos los transportadores de oxígeno que se visualizan en los volcano plot, son parte de las proteínas que son consideradas familia de P17. En el cuadrante derecho podemos observar, en color azul, las proteínas que pertenecen a la familia de P44, resultado que coincide con lo visto en la Figura 18.4, en donde queda expuesto que la intensidad en LPC es mucho mayor.

4.7 Estudio del metabolismo de *D. renale* a partir de datos genómicos y proteómicos

Gracias a la disponibilidad del genoma V1 y los datos proteómicos pudimos comenzar a buscar y ordenar diferentes genes y proteínas de gran importancia a la hora de definir la existencia o no de diferentes rutas metabólicas. Las mismas hacen a la bioquímica de dicho nematode y por ende nos daría la posibilidad, por ejemplo, de plantear diferentes estrategias para desarrollar blancos terapéuticos específicos para esta parasitosis, además de información valiosa para la caracterización del clado I, que como dijimos anteriormente, cuenta con escasa información.

Además de buscar las proteínas de interés en los datos genómicos también podemos comprobar o no su expresión mediante datos proteómicos.

Con el objetivo de buscar y caracterizar el metabolismo de *D. renale* se utilizó como guía el trabajo titulado *Comparative genomics of the major parasitic worms* (18). En el mismo se presenta un amplio estudio comparativo de 81 genomas de gusanos parásitos y de vida libre. Los ejemplos incluyen familias de genes que modulan las respuestas inmunitarias del huésped, permiten la migración del parásito a través de los tejidos del huésped o permiten que el parásito se alimente. También revelaron amplias diferencias específicas de linaje en el metabolismo central y las familias de proteínas históricamente seleccionadas para el desarrollo de fármacos.

Usando entonces esta información y sumando algunas hipótesis a partir de datos ya disponibles, se comenzó a buscar y esquematizar algunas de las rutas metabólicas más importantes.

Las búsquedas principales fueron:

1. **Vía de glucólisis/ gluconeogénesis:** Diferentes trabajos demuestran que estas vías se encuentran en la mayoría de los nematodos como mecanismo fundamental para la obtención de energía y síntesis de glucosa a partir de precursores más simples. Es de gran importancia constatar la presencia de esta ruta en *D. renale*, comprobar si está completa y que encontramos a nivel de expresión de proteínas (18). Ver resultados en la Figura 26.4.
2. **Vía de síntesis y degradación de lípidos:** El metabolismo de lípidos en general es un área muy poco explorada en nematodos parásitos. Particularmente, el catabolismo de lípidos en helmintos plantea varios problemas interesantes. Uno de estos interrogantes se basa en el hecho de que todas las enzimas de la β -oxidación suelen estar presentes mientras que la vía no está activa. Una posible explicación para esto es que la mayoría de los nematodos parásitos transitan ambientes con distintas presiones de oxígeno disponibles a lo largo de su ciclo de vida (19). De la misma manera la síntesis *de novo* de ácidos grasos parece estar completa en nematodos parásitos no obstante con muy baja o nula actividad (19). Ver figura 28.4 y 29.4.
3. **Ciclo del glioxilato:** A diferencia de la mayoría de los animales, los nematodos poseen el ciclo de glioxilato que permite la conversión de lípidos en carbohidratos, para su uso en biosíntesis (por ejemplo, durante el desarrollo

temprano) y para sobrellevar la inanición. El ciclo del glioxilato parece haberse perdido de forma independiente en las especies de filarias y *Trichinella sp.* (18)

4. **Citocromo c y ciclooxigenasas (cox):** al igual que sucede con la vía glucolítica el estudio de la fosforilación oxidativa nos ofrece información básica a acerca del metabolismo oxidativo de *D. renale*.
5. **Enzima alanino glicosil transaminasa:** esta enzima convierte el glioxilato en glicina. La glicina se puede convertir mediante el sistema de escisión de glicina (GCS) en 5,10-metilenetetrahidrofolato, lo que resulta útil para la biosíntesis de aminoácidos. Los géneros *Filaria* y *Trichinella sp* han perdido de forma independiente esta enzima (18). Ver Figura 27.4.
6. **Proteasas e inhibidores de proteasas:** Las proteasas y los inhibidores de proteasa realizan diversas funciones en los parásitos, incluida la inmunomodulación, la penetración en el tejido del huésped, la modificación del entorno del huésped (por ejemplo, la anticoagulación) y la digestión de la sangre/tejidos. En miembros del clado I como *Trichuris muris* se ha descrito una llamativa expansión de la familia I2 e I17, que incluye el inhibidor de la peptidasa de leucocitos secretores. Luego de los estudios realizados en el trabajo citado anteriormente (18), es evidente el confinamiento sorprendente de esta expansión a la mayoría de los parásitos del clado I. Es importante destacar que los motores de búsqueda de las proteasas y los inhibidores antes mencionados fueron tomados de los genomas de nematodos del clado I.

Las vías metabólicas mencionadas fueron tomadas de la Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG) (20,21) tomando como nematode modelo a

Caenorhabditis elegans. En base a esta información se confeccionó un archivo de tipo multi-FASTA según la vía metabólica estudiada y el mismo fue utilizado para realizar una búsqueda mediante el programa BLAST-P en la predicción de proteínas V1 de *D. renale*. En los resultados de cada una de las búsquedas se localizaban las proteínas de *D. renale* con un mayor valor de score, se copiaba su secuencia y a continuación se buscaba en bases de datos públicas para confirmar su identidad. Dichas bases de datos fueron UniProt, NCBI y Wormbase (1,22,23).

Los resultados fueron ordenados en tablas, donde se detallan las vías metabólicas estudiadas. En cada una se señala primero la proteína con la cual se realizó la búsqueda en el genoma V1 de *D. renale* utilizando código obtenido en KEGG, luego el ID de la proteína encontrada en *D. renale* mediante BLAST-P, su score, seguido del resultado de una segunda vuelta de búsqueda de la proteína de *D. renale* en bases de datos públicas y por último si se encuentra o no en el proteoma de *D. renale*.

Tabla I. Glucolisis/ gluconeogénesis

Query KEGG	Código D. renale	Score	BLAST-P Recíproco UniProt	Proteoma
K00844hexokinase [EC:2.7.1.1]	DREN_jg10591.t1	505	F14B4.2b wormpep=CE36925 gene=WBGene00008780 locus=hxk-1 status=Confirmed uniprot=Q6BET1 insdc=CAH0473 product="Phosphotransferase" Length = 495	Si
K08074ADP-dependent glucokinase [EC:2.7.1.147]	DREN_jg1355.t1	178	wormpep=CE33040 gene=WBGene00016810 status=Confirmed uniprot=Q86540 insdc=CCD65339.1 product="Probable ADP-dependent glucokinase" Length = 502	No
K01810 glucose-6-phosphate isomerase	DREN_jg8534.t1	804	Y87G2A.8b wormpep=CE36253 gene=WBGene00013597 locus=gpi-1 status=Confirmed uniprot=Q7K707 insdc=CAE54920.1 product="Glucose-6-phosphate isomerase"	Si
K008506-phosphofructokinase 1 [EC:2.7.1.11]	DREN_jg1726.t1	566	Y71H10A.1a wormpep=CE28266 gene=WBGene00022199 locus=pfk-1.1 status=Confirmed uniprot=Q9TZL8 insdc=CCD71595.1 product="ATP-dependent 6-phosphofructokinase 1"	Si

K01623fructose-bisphosphate aldolase, class I [EC:4.1.2.13]	DREN_g2307.t1	480	T05D4.1 wormpep=CE16341 gene=WBGene00011474 locus=aldo-1 status=Confirmed uniprot=P54216 insdc=CAB03291. product="Fructose-bisphosphate aldolase 1"	Si
K01803 triosephosphate isomerase (TIM) [EC:5.3.1.1]	DREN_jg1603.t1	323	Y17G7B.7 wormpep=CE19040 gene=WBGene00006601 locus=tpi-1 status=Confirmed uniprot=Q10657 insdc=CAA19447.1 product="Triosephosphate isomerase"	Si
K00134 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating)[EC:1.2.1.12]	DREN_jg208.t1	513	K10B3.7 wormpep=CE07370 gene=WBGene00001685 locus=gpd-3 status=Confirmed uniprot=P17330 insdc=CCD64599.1 product="Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3"	Si
K00927 phosphoglycerate kinase [EC:2.7.2.3]	DREN_jg2108.t1	606	T03F1.3 wormpep=CE13100 gene=WBGene00020185 locus=pgk-1 status=Confirmed uniprot=P91427 insdc=CCD67788.1 product="Probable phosphoglycerate kinase"	Si
K15633 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase [EC:5.4.2.12]	DREN_jg5442.t1	666	F57B10.3a wormpep=CE11302 gene=WBGene00019001 locus=ipgm-1 status=Confirmed uniprot=G5EFZ1 insdc=CCD71471. product="2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase"	Si
K01689enolase [EC:4.2.1.11]	DREN_jg4251.t1	661	T21B10.2c wormpep=CE36954 gene=WBGene00011884 locus=enol-1 status=Confirmed uniprot=Q27527 insdc=CAH10783.1 product="Enolase"	Si
K00873 pyruvate kinase [EC:2.7.1.40]	DREN_g3062.t1	700	F25H5.3a wormpep=CE15898 gene=WBGene00009126 locus=pyk-1 status=Confirmed uniprot=O17836 insdc=CAB02984.1 product="Pyruvate kinase"	No
K01596 phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) [EC:4.1.1.32]	DREN_jg5636.t1	917	R11A5.4a wormpep=CE12728 gene=WBGene00011232 locus=pck-2status=Confirmed uniprot=O02286 insdc=CAB05600.1 product="Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)"	Si

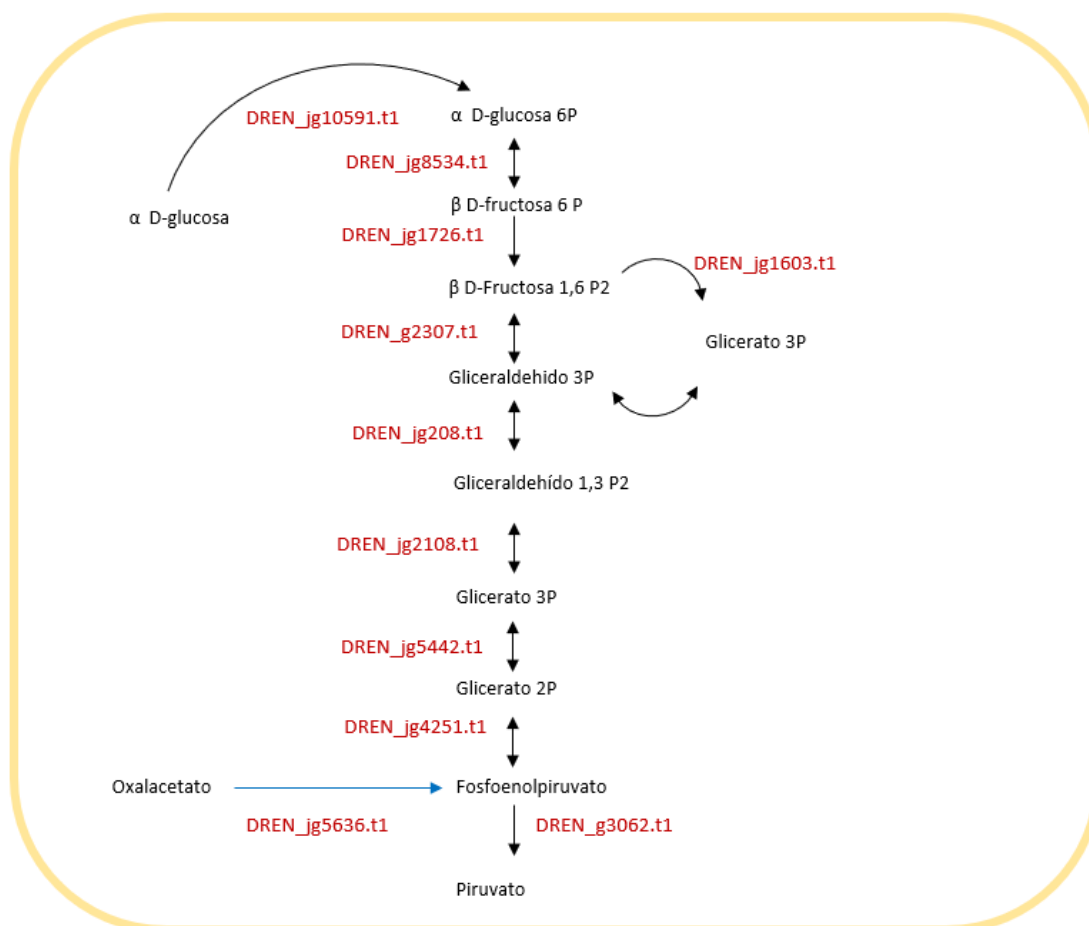


Figura 26.4: Esquema de la vía de la glucólisis y gluconeogénesis en *D. renale*. Podemos observar en rojo los genes encontrados en el genoma V1. Rutas metabólicas obtenidas de KEGG, código: 00010 M N.

Tabla II. Metabolismo de la Glicina

Query UniProt	Código <i>D.renale</i>	Score	BLASTBLAST-P recíproco. UniProt	Proteoma
P91408 alanine- glyoxylate transaminase c elegans	DREN_jg6029.t1	242	wormpep=CE33176 gene=WBGene00020382 status=Confirmed uniprot=O02158 insdc=CCD71992.1 product="Alanine--glyoxylate aminotransferase 2, mitochondrial" Length = 444	No

Tabla III. Ciclo del glioxilato

Query UniProt	Código <i>D. renale</i>	score	BLAST-P recíproco.BLAST NCBI	Proteoma
>sp P34575 CISY_CAEEL Probable citrate synthase, mitochondrial OS=Caenorhabditis elegans OX=6239 GN=cts-1 PE=3 SV=1	DREN_jg3249.t1	642	Select seq ref NP_499264.1 putative citrate synthase, mitochondrial [Caenorhabditis elegans]	Si
>sp P34455 ACON_CAEEL Probable aconitate hydratase, mitochondrial OS=Caenorhabditis elegans OX=6239 GN=aco-2 PE=3 SV=2	DREN_jg1223.t1	1109	Select seq ref NP_741235.1 putative aconitate hydratase, mitochondrial [Caenorhabditis elegans]	Si
>sp Q10663 GCP_CAEEL Bifunctional glyoxylate cycle protein OS=Caenorhabditis elegans OX=6239 GN=icl-1 PE=1 SV=2	no hit!!!!			
>sp O02640 MDHM_CAEEL Malate dehydrogenase, mitochondrial OS=Caenorhabditis elegans OX=6239 GN=mdh-2 PE=1 SV=1	DREN_jg5541.t1	399	Select seq ref NP_498457.1 putative malate dehydrogenase, mitochondrial [Caenorhabditis elegans]	Si

Tabla IV. Síntesis del grupo hemo

Query Uniprot	Código en <i>D. renale</i>
AAP72012.1 aminolevulinate, delta-, dehydratase [Homo sapiens]	NO HIT
NP_000181.2 porphobilinogen deaminase isoform 1 [Homo sapiens]	NO HIT
AAH02573.1 Uroporphyrinogen III synthase [Homo sapiens]	NO HIT
CAG33257.1 UROD [Homo sapiens]	NO HIT
NP_000088.3 oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase, mitochondrial precursor [Homo sapiens] mitochondrial precursor [Homo sapiens]	NO HIT
NP_000300.1 protoporphyrinogen oxidase isoform 1 [Homo sapiens]	NO HIT
AAH39841.2 Ferrochelatase (protoporphyrin) [Homo sapiens]	NO HIT

Tabla V. Proteínas que contienen grupo hemo

Query ID uniprot	Código <i>D. renale</i>	BLASTBLAST-P recíproco NCBI	Proteoma
Query= sp P76149 SAD_ECOLI Succinate semialdehyde dehydrogenase [NAD(P)+]Sad OS=Escherichia coli (strain K12) OX=83333 GN=sad PE=1 SV=2	DREN_jg4594.t1	HAL1847448.1 Select seq tpg HAL1847448.1 TPA: NADP-dependent succinate-semialdehyde dehydrogenase [Escherichia coli] VDP21836.1 Select seq emb VDP21836.1 unnamed protein product [Soboliphyme baturini] KRX70841.1 Succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial [Trichinella sp. T6]	Si

p Q86C56 Gcy31_CAEEL Soluble guanylate cyclase gcy-31 OS=Caenorhabditis elegans	DREN_jg2443.t1	NP_001249628.1 Select seq ref NP_001249628.1 Receptor-type guanylate cyclase gcy-28 [Caenorhabditis elegans] AAL77521.1 Select seq gb AAL77521.1 guanylyl cyclase [Caenorhabditis elegans]	No
tr A0A0V1AWH2 A0A0V1AWH2_TRISP Guanylate cyclase OS=Trichinella spiralis	DREN_jg2443.t1	KRY30306.1 Atrial natriuretic peptide receptor 1 [Trichinella spiralis] KRY34409.1 Select seq gb KRY34409.1 Guanylate cyclase 32E [Trichinella spiralis]	No
tr A0A0V0WYC2 A0A0V0WYC2_TRIPS Adenylate cyclase type 9 (Fragment) OS=Trichinella pseudospiralis	DREN_jg7894.t1	VDP07476.1 Select seq emb VDP07476.1 unnamed protein product [Soboliphyme baturini] KRY76577.1 Select seq gb KRY76577.1 Adenylate cyclase type 9 [Trichinella pseudospiralis]	No
tr Q966F9 Q966F9_CAEEL Adenylate cyclase OS=Caenorhabditis elegans	DREN_jg2122.t2	NP_504486.4 Adenylate cyclase [Caenorhabditis elegans]	No
tr Q21777 Q21777_CAEEL Zinc finger putative Transcription Factor family OS=Caenorhabditis elegans	DREN_jg10388.t1	NP_491001.2 Select seq ref NP_491001.2 SCRaTch (zinc finger transcriptional repressor) homolog [Caenorhabditis elegans]	No

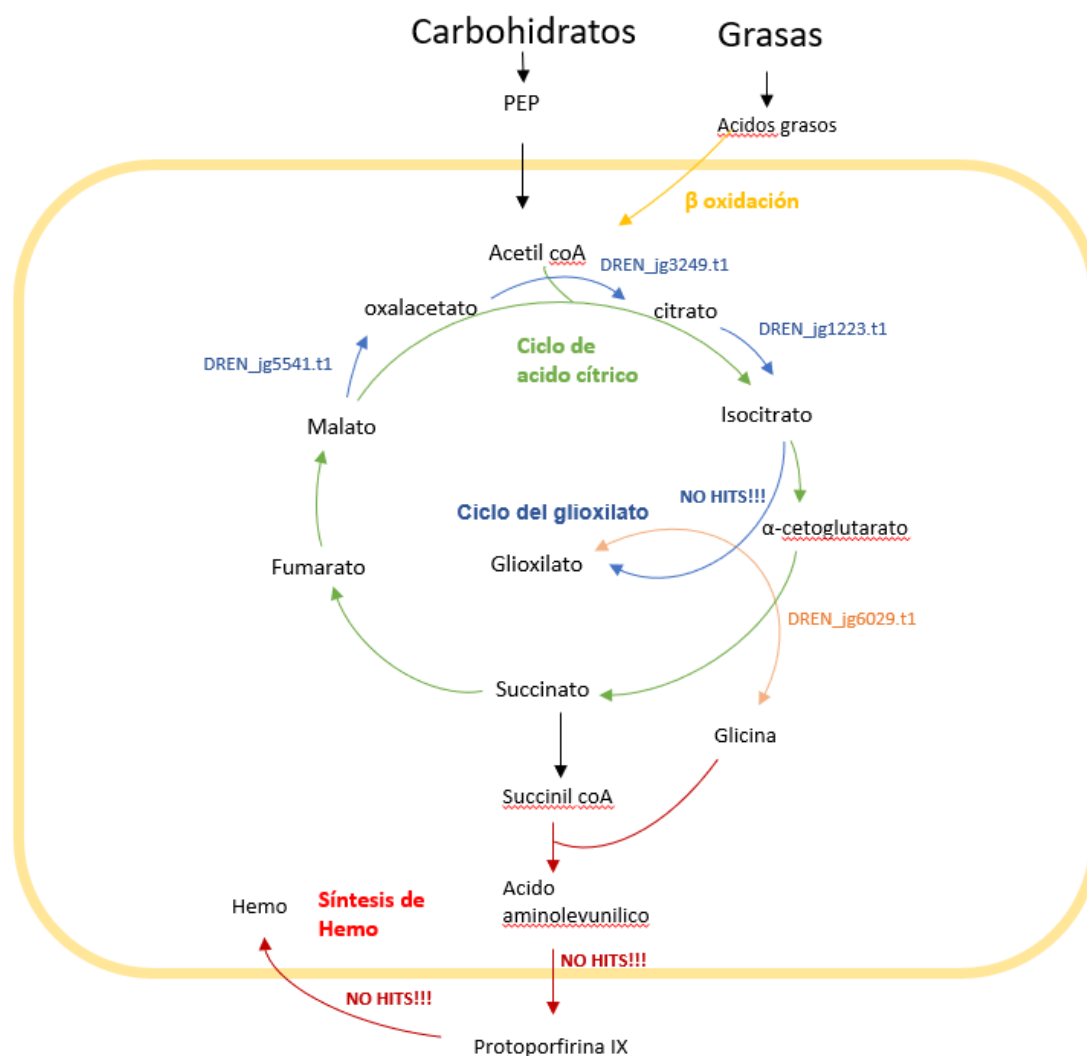


Figura 27.4: Detalle de rutas metabólicas importantes, vemos la ausencia de la vía de síntesis del grupo hemo (en rojo) y la de algunas de las proteínas esenciales para poder realizar el ciclo

del glioxilato (en azul, puedo visualizar tres proteínas de *D. renale* que se encuentran para esta ruta: DREN_jg5541.t1, DREN_jg3249.t1, DREN_jg1223.t1) . Rutas metabólicas obtenidas de KEGG: ciclo del glioxilato: código: 00630 M. ciclo del ácido cítrico: código: 00020 M. síntesis del Hemo Código: M00868.

Tabla VI. Síntesis de ácidos grasos

Query ID uniprot	Código <i>D. renale</i>	score	BLASTBLAST-P recíprocoNCBI	Proteo ma
>tr Q9GZI3 Q9GZI3_CAEE L Acetyl-CoA carboxylase OS=Caenorhabditis elegans OX=6239 GN=pod-2 PE=1 SV=1	DREN_jg1878.t1	684	Select seq ref NP_001254027.1 Acetyl-CoA carboxylase [Caenorhabditis elegans]	No
>tr P91871 P91871_CAEE L 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase OS=Caenorhabditis elegans OX=6239 GN=fasn-1 PE=1 SV=2	DREN_jg9663.t1	2614	Select seq ref NP_492417.2 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase [Caenorhabditis elegans]	No
>tr Q18660 Q18660_CAEE L Fatty Acid CoA Synthetase family OS=Caenorhabditis elegans OX=6239 GN=acs-17 PE=1 SV=2	DREN_jg3905.t1	688	Select seq ref NP_001360705.1 fatty Acid CoA Synthetase family [Caenorhabditis elegans]	No

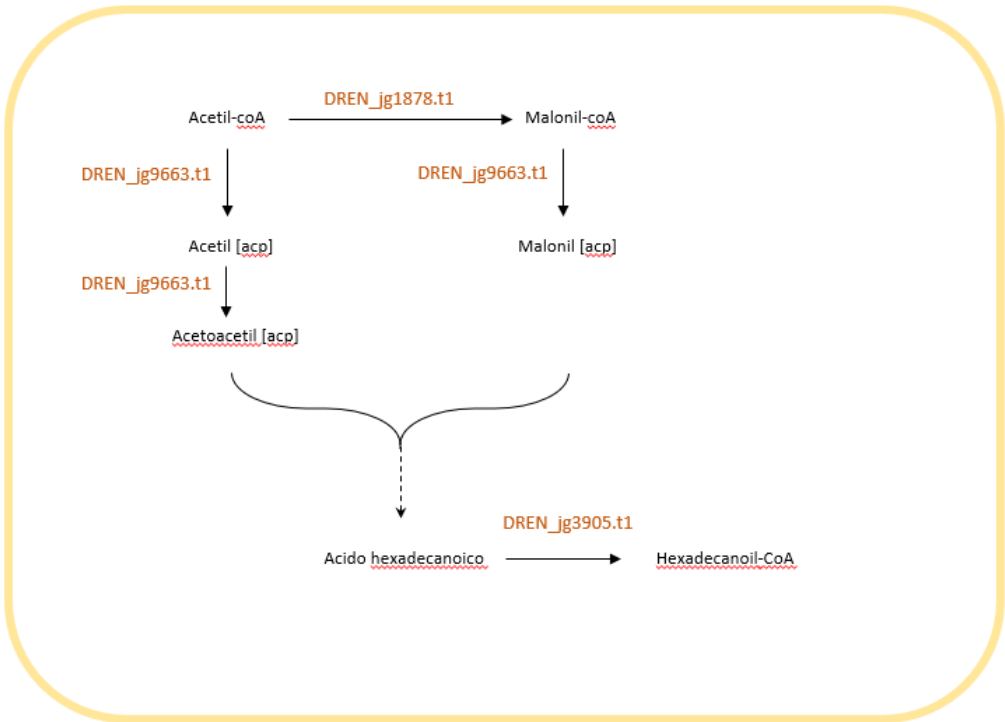


Figura 28.4: Biosíntesis de ácidos grasos. *D renale* cuenta con las proteínas necesarias para comenzar la biosíntesis a nivel genómico, pero no existe evidencia proteómica. Ruta metabólica obtenida de KEGG código: 00061.

Tabla VII. Degradación de ácidos grasos

Query Wormbase	Código <i>D. renale</i>	Score	BLASTBLAST-P recíproco wormbase	Proteoma
CPT -1, carnitina O-palmitoiltransferasa, W03F9.4, isoform a,	DREN_jg4838.t1	416	W03F9.4 ^a	No
CPT-2, carnitina O-palmitoiltransferasa, K07B1.4	DREN_jg4588.t1	495	R07H5.2 ^a	Si
ACOX-1.5, Acil-Coenzima A Oxidasa, CELE_C48B4.1	DREN_jg6406.t1	45.8	K06A5.6 ACDH-3	No
ACDH-12, acil-CoA deshidrogenasa, E04F6.5b	DREN_jg6406.t1	191	Select seq ref NP_001370606.1 Acyl CoA DeHydrogenase [Caenorhabditis elegans]	No
ECH-1.1, enoil-CoA hidratasa, CELE_C29F3.1	DREN_jg5346.t1	644	T08B2.7b ECH-1.2, isoform b	Si
HACD, 3-, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, B0272.3	DREN_jg4382.t1	355	B0272.3	Si
ACAT-1, acetil-CoA C-acetiltransferasa, T02G5.7	DREN_jg9251.t1	390	T02G5.8	Si

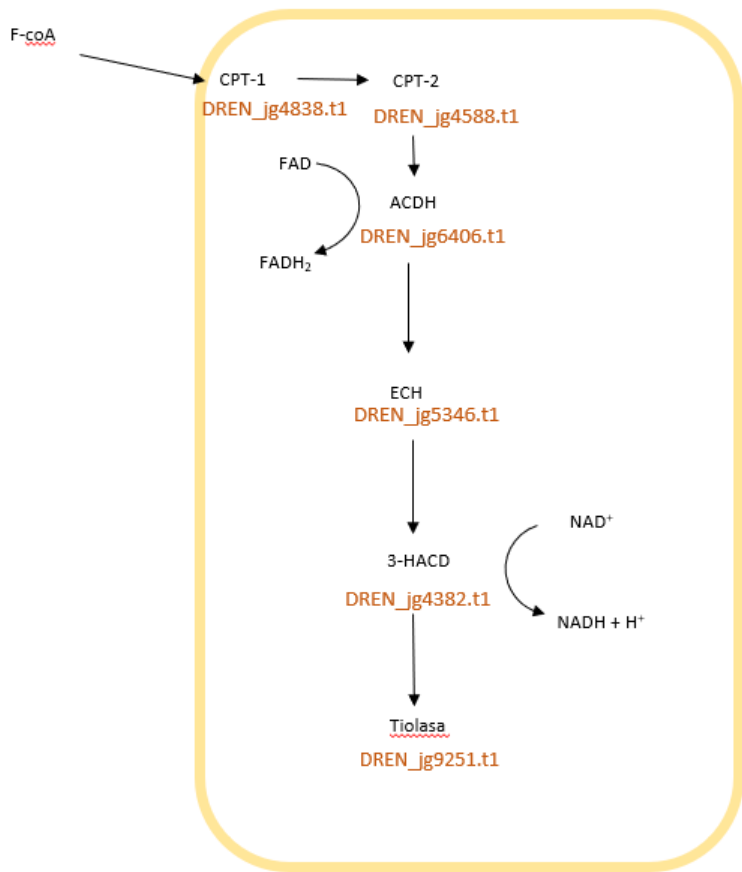


Figura 29.4: Vía de la β -oxidación en *D. renale*. Las proteínas representadas en el esquema son de *C. elegans*. Todos ellos presentan otólogos en *D. renale*. Ruta metabólica obtenida de KEGG código:00071. CPT: carnitina O-palmitoiltransferasa, ACDH: acil-CoA deshidrogenasa, ECH: enoil-CoA hidratasa, 3-HACD: 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, ACAT-1: acetil-CoA C-acetiltransferasa. flavín adenín dinucleótido: abreviado FAD en su forma oxidada y FADH2 en su

forma reducida, nicotin adenin dinucleótido: abreviado NAD⁺ en su forma oxidada y NADH en su forma reducida.

Tabla VIII. Fosforilación oxidativa

Query Wormbase	Código <i>D. renale</i>	score	BLASTBLAST-P recíproco Wormbase/UniProt	Proteoma
Cytochrome c 2.1	DREN_jg4399.t1	144	E04A4.7 wormpep=CE16968 gene=WBGene00017121 locus=cyc-2.1 status=Confirmed uniprot=P19974 insdc=CCD68708.1 product="Cytochrome c 2.1" Length = 111	Si
cel:CELE_Y46G5A.2 K02257 heme o synthase [EC:2.5.1.141] (RefSeq) cox-10; Protoheme IX farnesyltransferase, mitochondrial (A)	DREN_g3926.t1	242	W08D2.5a wormpep=CE53002 gene=WBGene00012341 locus=catp-6 status=Confirmed uniprot=Q27533 insdc=CAA94236.3 product="Probable cation-transporting ATPase W08D2.5"	No
cel:COX3 K02262 cytochrome c oxidase subunit 3 (RefSeq) cytochrome c oxidase subunit III (A)	no hits			
cel:COX1 K02256 cytochrome c oxidase subunit 1 [EC:7.1.1.9] (RefSeq) cytochrome c oxidase subunit I (A)	no hits			
cel:COX2 K02261 cytochrome c oxidase subunit 2 (RefSeq) cytochrome c oxidase subunit II (A)	no hits			
cel:CELE_W09C5.8 K02263 cytochrome c oxidase subunit 4 (RefSeq) cox-4; Cytochrome OXidase assembly protein (A)	DREN_g9258.t1	148	K04F1.13 wormpep=CE36878 gene=WBGene00019392 locus=irld-44 status=Partially_confirmed uniprot=Q9TXL8 insdc=CCD72644.1	Si
>cel:CELE_Y37D8A.14 K02264 cytochrome c oxidase subunit 5a (RefSeq) cox-5A; Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial (A)	DREN_jg3621.t1	142	W09C5.8 wormpep=CE20171 gene=WBGene00012354 locus=cox-4 status=Confirmed uniprot=Q9U329 insdc=CAB63334.1 product="Cytochrome c oxidase subunit 4"	Si
cel:CELE_Y37D8A.14 K02264 cytochrome c oxidase subunit 5a (RefSeq) cox-5A; Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial (A)	DREN_jg9144.t1	157	Y37D8A.14 wormpep=CE20218 gene=WBGene00012553 locus=cox-5A status=Confirmed uniprot=P55954 insdc=CAA21532.1 product="Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial"	Si
cel:CELE_F26E4.9 K02265 cytochrome c oxidase subunit 5b (RefSeq) cox-5B; Cytochrome OXidase assembly protein (A)	DREN_g1859.t1	86,7	F26E4.9 wormpep=CE09693 gene=WBGene00000371 locus=cox-5B status=Confirmed uniprot=P90849 insdc=CAB03002.1	Si

cel:CELE_F54D8.2 K02266 cytochrome c oxidase subunit 6a (RefSeq) cox-6A; Cytochrome c oxidase subunit 6A, mitochondrial (A)	DREN_jg5902.t 1	51,6	F54D8.2 wormpep=CE01308 gene=WBGene00006519 locus=cox-6A status=Confirmed uniprot=Q20779 insdc=CCD67407.1 product="Cytochrome c oxidase subunit 6A, mitochondrial"	Si
cel:CELE_Y71H2AM.5 K02267 cytochrome c oxidase subunit 6b (RefSeq) cox-6B; Cytochrome OXidase assembly protein (A)	DREN_jg4541.t 1	81,3	Y71H2AM.5 wormpep=CE22939 gene=WBGene00022170 locus=cox-6B status=Confirmed uniprot=Q9BL34 insdc=CCD73863.1	No
cel:CELE_F29C4.2 K02268 cytochrome c oxidase subunit 6c (RefSeq) cox-6C; COX6C domain-containing protein (A)	DREN_jg10302. t1	42,7	F29C4.2 wormpep=CE17720 gene=WBGene00017926 locus=cox-6C status=Confirmed uniprot=O76367 insdc=CCD62177.1 product="COX6C domain- containing protein"	No
cel:CELE_F26E4.6 K02272 cytochrome c oxidase subunit 7c (RefSeq) cox-7C; Cytochrome OXidase assembly protein (A)	no hits			
cel:CELE_JC8.5 K02258 cytochrome c oxidase assembly protein subunit 11 (RefSeq) cox-11; Cytochrome OXidase assembly protein (A)	DREN_jg1718.t 1	229	JC8.5a wormpep=CE38202 gene=WBGene00010437 locus=cox-11 status=Confirmed uniprot=Q95QD5 insdc=CAB05232.2	No
cel:CELE_T06D8.5 K02259 heme a synthase [EC:1.17.99.9] (RefSeq) cox-15; Cytochrome OXidase assembly protein (A)	DREN_jg5999.t 1	385	T06D8.5 wormpep=CE02326 gene=WBGene00011526 locus=cox-15 status=Confirmed uniprot=Q22251 insdc=CAA88968.1	No
cel:CELE_F40G9.2 K02260 cytochrome c oxidase assembly protein subunit 17 (RefSeq) cox-17; Cytochrome OXidase assembly protein	DREN_g7233.t1	63,5	F40G9.2 wormpep=CE19849 gene=WBGene00018240 locus=cox-17 status=Confirmed uniprot=Q9TZ68 insdc=CCD70928.1	No

Tabla IX. Proteasas e inhibidores de proteasas

Query I2 <i>Trichuris trichiura</i> UniProt	Código <i>D. renale</i>	score	BLASTBLAST-P recíproco UnoProt	Proteoma
tr A0A077Z3L6 A0A077Z3L6_TRITR Spondin-1 OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000251801 PE=4 SV=1	DREN_g3114.t1	1000	Select seq emb CDW54248.1 Spond N and Reeler and Kunitz BPTI and TSP 1 doma in containing protein [Trichuris trichiura]	No
tr A0A077Z120 A0A077Z120_TRITR Papilin OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000168301 PE=4 SV=1	DREN_jg10613.t1	559	Select seq emb CDW53418.1 papilin [Trichuris trichiura]	Si
tr A0A077Z445 A0A077Z445_TRITR Mesocentin OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000351901 PE=4 SV=1	DREN_jg4218.t1	974	Select seq emb CDW55247.1 Mesocentin [Trichuris trichiura]	No
tr A0A077YUJ5 A0A077YUJ5_TRITR Kunitz protease inhibitor OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000000601 PE=4 SV=1	DREN_jg9862.t1	145	Select seq emb CDW57128.1 Papilin [Trichuris trichiura]	No
tr A0A077YWB1 A0A077YWB1_TRITR Putative kunitz OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000035001 PE=4 SV=1	DREN_jg10595.t1	153	Select seq emb CDW53418.1 papilin [Trichuris trichiura]	No

tr A0A077Z9R9 A0A077Z9R9_TRITR Kunitz BPTI domain containing protein OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000541401 PE=4 SV=1	DREN_g3615.t1	414	Select seq emb CDW57127.1 Kunitz BPTI domain containing protein [Trichuris trichiura]	Si
tr A0A077ZL56 A0A077ZL56_TRITR Papilin OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000948401 PE=4 SV=1	DREN_g3615.t1	162	Select seq emb CDW57127.1 Kunitz BPTI domain containing protein [Trichuris trichiura]	Si
tr A0A077Z2S6 A0A077Z2S6_TRITR Protein mig c protein mig b protein mig a OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000127801 PE=4 SV=1	DREN_jg2834.t1	2349	Select seq emb CDW53015.1 protein mig c; protein mig b; protein mig a [Trichuris trichiura]	Si
Query= tr A0A077Z1Y7 A0A077Z1Y7_TRITR Kunitz:Bovine pancreatic trypsin OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000278701 PE=4 SV=1	DREN_jg10595.t1	53,5	Select seq emb CDW53418.1 papilin [Trichuris trichiura]	No
tr A0A077ZIM7 A0A077ZIM7_TRITR Papilin OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000779201 PE=4 SV=1	DREN_g3615.t1	358	Select seq emb CDW53015.1 protein mig c; protein mig b; protein mig a [Trichuris trichiura]	Si
tr A0A077ZMW0 A0A077ZMW0_TRITR Kunitz BPTI domain containing protein (Fragment) OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000951901 PE=4 SV=1	DREN_g3615.t1	151	Select seq emb CDW53015.1 protein mig c; protein mig b; protein mig a [Trichuris trichiura]	Si
tr A0A077YUJ5 A0A077YUJ5_TRITR Kunitz protease inhibitor OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000000601 PE=4 SV=1	DREN_jg9862.t1	145	Select seq emb CDW57128.1 Papilin [Trichuris trichiura]	No
tr A0A077ZA04 A0A077ZA04_TRITR Tissue factor pathway inhibitor OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000476801 PE=4 SV=1	DREN_jg9862.t1	64,7	Select seq emb CDW57128.1 Papilin [Trichuris trichiura]	No
tr A0A077ZET4 A0A077ZET4_TRITR Kunitz:Bovine pancreatic trypsin OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000633901 PE=4 SV=1	DREN_jg85.t2	592	Select seq emb CDW58038.1 kunitz:Bovine pancreatic trypsin [Trichuris trichiura]	Si
tr A0A077ZE21 A0A077ZE21_TRITR Serine protease inhibitor 2 OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000692901 PE=4 SV=1	DREN_jg9862.t1	145	Select seq emb CDW57128.1 Papilin [Trichuris trichiura]	No
tr A0A077ZH70 A0A077ZH70_TRITR Kunitz BPTI domain containing protein OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000801501 PE=4 SV=1	DREN_jg10613.t1	83,2	Select seq emb CDW53418.1 papilin [Trichuris trichiura]	Si
tr A0A077ZJB7 A0A077ZJB7_TRITR Tissue factor pathway inhibitor 2 (Fragment) OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000887301 PE=4 SV=1	DREN_jg1421.t1	155	Select seq emb CDW59788.1 Tyrosine-protein kinase Fps85D [Trichuris trichiura]	Si
tr A0A077YZ98 A0A077YZ98_TRITR Kunitz BPTI and Lustrin cystein domain containing protein OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000167701 PE=4 SV=1	DREN_jg6655.t1	787	Select seq emb CDW52677.1 kunitz:Bovine pancreatic trypsin inhibitor [Trichuris trichiura]	No
tr A0A077ZM77 A0A077ZM77_TRITR Lustrin cystein and Kunitz BPTI domain containing protein OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000925101 PE=4 SV=1	DREN_jg2890.t1	125	Select seq emb CDW52677.1 kunitz:Bovine pancreatic trypsin inhibitor [Trichuris trichiura]	No

tr A0A077ZE89 A0A077ZE89_TRITR Kunitz BPTI and Lustrin cystein domain containing protein OS=Trichuris trichiura OX=36087	DREN_jg2117.t1	143	Select seq emb CDW52677.1 kunitz:Bovine pancreatic trypsin inhibitor [Trichuris trichiura]	No
tr A0A077ZPS9 A0A077ZPS9_TRITR Kunitz BPTI domain containing protein OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000914301 PE=4 SV=1	DREN_g3615.t1	92	Select seq emb CDW57127.1 Kunitz BPTI domain containing protein [Trichuris trichiura]	Si
tr A0A077ZFK9 A0A077ZFK9_TRITR Kunitz:Bovine pancreatic trypsin OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000694301 PE=4 SV=1	DREN_g1895.t1	431	Select seq emb CDW58619.1 kunitz:Bovine pancreatic trypsin [Trichuris trichiura]	Si
tr A0A077YXC4 A0A077YXC4_TRITR Kunitz:Bovine pancreatic trypsin inhibitor OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000093901 PE=4 SV=1	DREN_jg6655.t1	807	Select seq emb CDW52677.1 kunitz:Bovine pancreatic trypsin inhibitor [Trichuris trichiura]	No
tr A0A077ZC93 A0A077ZC93_TRITR Papilin OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000541501 PE=4 SV=1	DREN_jg9862.t1	262	Select seq emb CDW57128.1 Papilin [Trichuris trichiura]	No
tr A0A077ZM79 A0A077ZM79_TRITR Putative kunitz OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000925201 PE=4 SV=1	DREN_jg2890.t1	78,6	Select seq emb CDW52677.1 kunitz:Bovine pancreatic trypsin inhibitor [Trichuris trichiura]	No
tr A0A077YW19 A0A077YW19_TRITR Kunitz BPTI and Lustrin cystein domain containing protein OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000067601 PE=4 SV=1	DREN_jg3533.t1	112	Select seq emb CDW58619.1 kunitz:Bovine pancreatic trypsin [Trichuris trichiura]	No

Query I17 <i>Trichuris trichiura</i> UniProt	Código D. renale	score	BLASTBLAST-P recíproco UniProt	Proteoma
tr A0A077Z7S7 A0A077Z7S7_TRITR WAP domain containing protein, SLPI-like OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000453601 PE=4 SV=1	DREN_jg10336.t2	70,1	Select seq emb CDW59922.1 zf-C3Hc3H domain containing protein [Trichuris trichiura]	No
tr A0A077ZD43 A0A077ZD43_TRITR WAP domain containing protein, SLPI-like OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000657901 PE=4 SV=1	DREN_g6091.t1	42,7	Select seq emb CAA55584.1 Tt52 [Trichuris trichiura]	No
tr A0A077YYJ8 A0A077YYJ8_TRITR WAP domain containing protein, SLPI-like OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000115301 PE=4 SV=1	DREN_jg1606.t1	90,1	Select seq gb AAC04763.1 putative porin precursor [Trichuris trichiura]	No
tr A0A077ZHX8 A0A077ZHX8_TRITR WAP domain containing protein, SLPI-like OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000834401 PE=4 SV=1	DREN_jg6593.t1	121	Select seq emb CDW53570.1 WAP domain containing protein, SLPI-like [Trichuris trichiura]	No
tr A0A077ZB55 A0A077ZB55_TRITR WAP domain containing protein, SLPI-like OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000415901 PE=4 SV=1	DREN_jg1608.t1	73,6	Select seq gb AAC04763.1 putative porin precursor [Trichuris trichiura]	No

tr A0A077Z4C2 A0A077Z4C2_TRITR WAP domain containing protein, SLPI-like OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000183501 PE=4 SV=1	DREN_jg6593.t1	125	Select seq emb CDW53570.1 WAP domain containing protein, SLPI-like [Trichuris trichiura]	No
tr A0A077ZJX5 A0A077ZJX5_TRITR WAP domain containing protein, SLPI-like OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000834001 PE=4 SV=1	DREN_jg1608.t1	209	Select seq gb AAC04763.1 putative porin precursor [Trichuris trichiura]	No
tr A0A077Z0W7 A0A077Z0W7_TRITR WAP domain containing protein, SLPI-like OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000188401 PE=4 SV=1	DREN_jg1606.t1	58,5	Select seq gb AAC04763.1 putative porin precursor [Trichuris trichiura]	No
tr A0A077ZDD4 A0A077ZDD4_TRITR WAP domain containing protein, SLPI-like OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000616001 PE=4 SV=1	DREN_jg6835.t1	50,8	Select seq emb CDW52482.1 WAP domain containing protein, SLPI-like [Trichuris trichiura]	No
tr A0A077YWQ4 A0A077YWQ4_TRITR WAP domain containing protein, SLPI-like OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000074401 PE=4 SV=1	DREN_jg6835.t2		Select seq emb CDW52482.1 WAP domain containing protein, SLPI-like [Trichuris trichiura]	No
tr A0A077Z8Y1 A0A077Z8Y1_TRITR WAP domain containing protein, SLPI-like OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000449401 PE=4 SV=1	DREN_g6089.t1	105	Select seq gb AAC04763.1 putative porin precursor [Trichuris trichiura]	No
tr A0A077Z7Y3 A0A077Z7Y3_TRITR WAP domain containing protein, SLPI-like OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000460301 PE=4 SV=1	DREN_jg3736.t1	53,9	Select seq emb CDW52891.1 WAP domain containing protein, SLPI-like [Trichuris trichiura]	Si
tr A0A077ZKH8 A0A077ZKH8_TRITR WAP domain containing protein, SLPI-like OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000862301 PE=4 SV=1	DREN_jg6835.t1	54,7	Select seq emb CDW52482.1 WAP domain containing protein, SLPI-like [Trichuris trichiura]	No
tr A0A077ZDT1 A0A077ZDT1_TRITR WAP domain containing protein, SLPI-like OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000594101 PE=4 SV=1	DREN_jg10336.t2	62	Select seq emb CDW59922.1 zf-C3Hc3H domain containing protein [Trichuris trichiura]	No
tr A0A077ZLR3 A0A077ZLR3_TRITR WAP domain containing protein, SLPI-like OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000905401 PE=4 SV=1	DREN_g6089.t1	74,3	Select seq gb AAC04763.1 putative porin precursor [Trichuris trichiura]	No
tr A0A077ZHN9 A0A077ZHN9_TRITR WAP domain containing protein, SLPI-like (Fragment) OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000824601 PE=4 SV=1	DREN_jg1608.t1	72	Select seq gb AAC04763.1 putative porin precursor [Trichuris trichiura]	No
tr A0A077Z646 A0A077Z646_TRITR WAP domain containing protein, SLPI-like OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000239901 PE=4 SV=1	DREN_g4221.t1	57,4	Select seq emb CDW52482.1 WAP domain containing protein, SLPI-like [Trichuris trichiura]	Si
tr A0A077Z8E0 A0A077Z8E0_TRITR WAP domain containing protein, SLPI-like OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000498901 PE=4 SV=1	DREN_jg1608.t1	72,8	Select seq gb AAC04763.1 putative porin precursor [Trichuris trichiura]	No

tr A0A077Z0H9 A0A077Z0H9_TRITR WAP domain containing protein, SLPI-like OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000221101 PE=4 SV=1	DREN_g4221.t1	57,8	Select seq emb CDW52482.1 WAP domain containing protein, SLPI-like [Trichuris trichiura]	Si
tr A0A077YX11 A0A077YX11_TRITR WAP domain containing protein, SLPI-like OS=Trichuris trichiura OX=36087 GN=TTRE_0000074301 PE=4 SV=1	DREN_jg6593.t1	71,6	Select seq emb CDW53570.1 WAP domain containing protein, SLPI-like [Trichuris trichiura]	No

Query I2 <i>soboliphyme baturini</i> UniProt	codigo Dr	score	BLASTBLAST-P recíproco WB	Proteoma
tr A0A183IN46 A0A183IN46_9BILA Spondin-1 OS=Soboliphyme baturini OX=241478 GN=SBAD_LOCUS5042 PE=4 SV=1	DREN_g3114.t1	1347	A0A183IN46 Spondin-1 (Soboliphyme baturini) F10E7.4 wormpep=CE32368 gene=WBGene00006893 locus=spon-1 status=Confirmed uniprot=Q19305 insdc=CCD69166.1 product="F-spondin"	No
tr A0A183IIG2 A0A183IIG2_9BILA BPTI/Kunitz inhibitor domain-containing protein OS=Soboliphyme baturini OX=241478 GN=SBAD_LOCUS3407 PE=4 SV=1	DREN_jg2913.t1	148	A0A183IF64 Uncharacterized protein (Soboliphyme baturini)W01F3.3d wormpep=CE43619 gene=WBGene00012186 locus=mlt-11 status=Confirmed uniprot=C1P659 insdc=CAX65075.1 Length = 3120	Si
tr A0A183IAB2 A0A183IAB2_9BILA Thyroglobulin type-1 domain-containing protein OS=Soboliphyme baturini OX=241478 GN=SBAD_LOCUS556 PE=4 SV=1	DREN_jg4218.t1	344	A0A183IAB2 Thyroglobulin type-1 domain-containing protein (Soboliphyme baturini)	No
tr A0A183IKA2 A0A183IKA2_9BILA BPTI/Kunitz inhibitor domain-containing protein OS=Soboliphyme baturini OX=241478 GN=SBAD_LOCUS4048 PE=4 SV=1	DREN_jg10595.t1	248	A0A183IKA2 BPTI/Kunitz inhibitor domain-containing protein (Soboliphyme baturini)	No
tr A0A183IDS5 A0A183IDS5_9BILA BPTI/Kunitz inhibitor domain-containing protein OS=Soboliphyme baturini OX=241478 GN=SBAD_LOCUS1769 PE=4 SV=1	DREN_jg7689.t1	271	A0A183IDS5 BPTI/Kunitz inhibitor domain-containing protein (Soboliphyme baturini)	Si
tr A0A183I902 A0A183I902_9BILA BPTI/Kunitz inhibitor domain-containing protein OS=Soboliphyme baturini OX=241478 GN=SBAD_LOCUS96 PE=4 SV=1	DREN_jg85.t3	64,7	A0A183IWG4 Uncharacterized protein (Soboliphyme baturini)	Si
Query= tr A0A183IGI0 A0A183IGI0_9BILA BPTI/Kunitz inhibitor domain-containing protein OS=Soboliphyme baturini OX=241478 PE=4 SV=1	DREN_g3661.t1	101	A0A183IGH9 Uncharacterized protein (Soboliphyme baturini)	No
Query= tr A0A183IG27 A0A183IG27_9BILA BPTI/Kunitz inhibitor domain-containing protein OS=Soboliphyme baturini OX=241478 GN=SBAD_LOCUS2571 PE=4 SV=1	DREN_jg2117.t1	796	A0A183IG27 BPTI/Kunitz inhibitor domain-containing protein (Soboliphyme baturini)	No

Query= tr A0A183IQN5 A0A183IQN5_9BILA Uncharacterized protein OS=Soboliphyme baturini OX=241478 GN=SBAD_LOCUS5932 PE=4 SV=1	DREN_jg1274.t1	277	A0A183IQN5 Uncharacterized protein (Soboliphyme baturini)	No
tr A0A183IZP4 A0A183IZP4_9BILA Uncharacterized protein OS=Soboliphyme baturini OX=241478 GN=SBAD_LOCUS9092 PE=4 SV=1	DREN_jg9862.t1	411	A0A183IZP4 Uncharacterized protein (Soboliphyme baturini)	No
tr A0A183ITP2 A0A183ITP2_9BILA Uncharacterized protein OS=Soboliphyme baturini OX=241478 GN=SBAD_LOCUS6989 PE=4 SV=1	DREN_jg3533.t1	357	A0A183ITP2 Uncharacterized protein (Soboliphyme baturini)	No
tr A0A183IFW4 A0A183IFW4_9BILA Uncharacterized protein OS=Soboliphyme baturini OX=241478 GN=SBAD_LOCUS2508 PE=4 SV=1	DREN_jg6655.t1	1537	A0A183IFW4 Uncharacterized protein (Soboliphyme baturini)	No
Query= tr A0A183ICH4 A0A183ICH4_9BILA Uncharacterized protein OS=Soboliphyme baturini OX=241478 GN=SBAD_LOCUS1318 PE=4 SV=1	DREN_g1895.t1	392	A0A183ICH4 Uncharacterized protein (Soboliphyme baturini)	Si
tr A0A183IZR8 A0A183IZR8_9BILA Uncharacterized protein OS=Soboliphyme baturini OX=241478 GN=SBAD_LOCUS9115 PE=4 SV=1	DREN_jg10595.t1	215	A0A183IKA2 BPTI/Kunitz inhibitor domain-containing protein (Soboliphyme baturini)	No
tr A0A183J9T4 A0A183J9T4_9BILA Uncharacterized protein OS=Soboliphyme baturini OX=241478 GN=SBAD_LOCUS12632 PE=4 SV=1	DREN_jg7693.t1	145	VDP21130.1 unnamed protein product [Soboliphyme baturini]	Si
tr A0A183IRT6 A0A183IRT6_9BILA Uncharacterized protein OS=Soboliphyme baturini OX=241478 GN=SBAD_LOCUS6333 PE=4 SV=1	DREN_jg10613.t1	263	Select seq emb VDP09778.1 unnamed protein product [Soboliphyme baturini]	Si
tr A0A183ITQ6 A0A183ITQ6_9BILA Uncharacterized protein OS=Soboliphyme baturini OX=241478 GN=SBAD_LOCUS7003 PE=4 SV=1	DREN_jg2834.t1	2046	Select seq emb VDP11473.1 unnamed protein product [Soboliphyme baturini]	Si
tr A0A183IRT5 A0A183IRT5_9BILA Uncharacterized protein OS=Soboliphyme baturini OX=241478 GN=SBAD_LOCUS6332 PE=4 SV=1	DREN_jg10613.t1	379	Select seq emb VDP09778.1 unnamed protein product [Soboliphyme baturini]	Si
tr A0A183IWG4 A0A183IWG4_9BILA Uncharacterized protein OS=Soboliphyme baturini OX=241478 GN=SBAD_LOCUS7961 PE=4 SV=1	DREN_jg85.t1	692	Select seq emb VDP02097.1 unnamed protein product [Soboliphyme baturini]	Si
tr A0A183IIN9 A0A183IIN9_9BILA Uncharacterized protein OS=Soboliphyme baturini OX=241478 GN=SBAD_LOCUS3484 PE=4 SV=1	DREN_jg5148.t1	233	Select seq emb VDP01310.1 unnamed protein product [Soboliphyme baturini]	No
tr A0A183J4B9 A0A183J4B9_9BILA Uncharacterized protein OS=Soboliphyme baturini OX=241478 PE=4 SV=1	DREN_jg7693.t1	110	Select seq emb VDP21130.1 unnamed protein product [Soboliphyme baturini]	Si

tr A0A183IGI2 A0A183IGI2_9BILA Uncharacterized protein OS=Soboliphyme baturini OX=241478 GN=SBAD_LOCUS2726 PE=4 SV=1	DREN_g3660.t1	221	A0A183IED1 PEHE domain- containing protein (Soboliphyme baturini)	No
	DREN_jg2889.t2	221	Select seq emb VDP24396.1 unnamed protein product [Soboliphyme baturini]	No

Query I17 <i>Soboliphyme baturini</i> UniProt	Código D. <i>renale</i>	score	BLAST-P recíproco UniProt	Proteom a
tr A0A183IIW8 A0A183IIW8_9BILA WAP domain-containing protein OS=Soboliphyme baturini OX=241478 GN=SBAD_LOCUS3564 PE=4 SV=1	DREN_jg6593. t1	314	Select seq emb VDP01591.1 unnamed protein product [Soboliphyme baturini]	No
tr A0A183IK85 A0A183IK85_9BILA Uncharacterized protein OS=Soboliphyme baturini OX=241478 GN=SBAD_LOCUS4031 PE=4 SV=1	DREN_jg6697. t1	1061	Select seq emb VDP03126.1 unnamed protein product [Soboliphyme baturini]	No
tr A0A183IC82 A0A183IC82_9BILA WAP domain-containing protein OS=Soboliphyme baturini OX=241478 GN=SBAD_LOCUS1226 PE=4 SV=1	DREN_jg2685. t1	244	Select seq emb VDO93640.1 unnamed protein product [Soboliphyme baturini]	No
tr A0A183IZL2 A0A183IZL2_9BILA WAP domain-containing protein OS=Soboliphyme baturini OX=241478 GN=SBAD_LOCUS9060 PE=4 SV=1	DREN_jg1608. t1	109	Select seq emb VDO93640.1 unnamed protein product [Soboliphyme baturini]	No
tr A0A183IRK2 A0A183IRK2_9BILA Uncharacterized protein OS=Soboliphyme baturini OX=241478 PE=4 SV=1	DREN_jg1608. t1	1463	Select seq emb VDO93640.1 unnamed protein product [Soboliphyme baturini]	No
tr A0A183IXF0 A0A183IXF0_9BILA Uncharacterized protein OS=Soboliphyme baturini OX=241478 GN=SBAD_LOCUS8296 PE=4 SV=1	DREN_jg3705. t1	228	Select seq emb VDP16351.1 unnamed protein product [Soboliphyme baturini]	No

4.8 Resumen del capítulo

En este capítulo abordamos un estudio amplio e integral del nematode parásito *D. renale*, más general en el sentido de la amplitud de información bioquímica y biológica a la que pudimos acceder debido a que logramos generar herramientas fundamentales, como lo son el genoma y el proteoma de dicho nematode. Estos datos sientan las bases para poder realizar una amplia cantidad de estudios.

Al comienzo de este capítulo planteamos varias preguntas que nos resultan fundamentales para entender la biología de *D. renale* y por consecuencia para poder pensar posibles marcadores diagnósticos. Si bien hasta el momento, no se encontraron todas las respuestas, pudimos avanzar en diferentes aspectos, que aportan posibilidades a la hora de plantear estrategias para la búsqueda de marcadores diagnósticos o fármacos específicos. Por otra parte, también se expusieron diferentes aspectos metabólicos que aportan en el conocimiento, no solo de *D. renale*, sino también en el clado I en general.

Al contar con un genoma y a raíz de este, con una predicción de proteínas, se pudo acceder a las secuencias completas de P44 y P17, y de esta forma confirmar la identidad de ambas. Además, se pudieron realizar diferentes búsquedas, que dieron como resultado el poder asociar a ambas proteínas con diferentes familias a las cuales pertenecen.

P44, que se trata de una proteína que une lípidos, forma parte de una familia que consta de cinco proteínas, predichas a partir de los datos genómicos, todas contienen péptido señal. De estas cinco, se confirmó la expresión de dos, al encontrarlas en nuestros datos

proteómicos, cuyos códigos son los siguientes: DREN_jg2306.t1 y DREN_jg2277.t1. Al analizar los resultados de espectrometría de masas mediante Perseus, se observa que estas dos proteínas presentan un comportamiento aproximado, en cuanto al perfil de intensidad encontrado en los diferentes tejidos, aunque existe una marcada diferencia de intensidad. Estos resultados indican que presentan diferentes concentraciones, pero siempre manteniendo una relación proporcional entre ambas en cada tejido. Estas proteínas serían isoformas, que podrían tanto tener funciones diferentes como reforzar su actividad entre sí.

En cuanto a P17, se encontraron siete proteínas en el genoma, que dan buen alineamiento de secuencia aminoacídica y todas pueden ser reconocidas como globinas transportadoras de oxígeno. De estas siete proteínas, se encontraron cinco dentro de nuestros datos proteómicos: 1) DREN_jg5692 = DREN_g999.t1, 2) DREN_jg5691.t1 = DREN_g998.t1, 3) DREN_jg6114.t = DREN_g1175.t1, 4) DREN_jg1272.t1 = DREN_g7721.t1, 5) DREN_jg7232.t1 = DREN_g7750.t1. Al analizar el perfil de intensidades para cada tejido se observa que, a diferencia de las P44s, estas presentan marcadas diferencias en las distribuciones de sus intensidades en los diferentes tejidos. Esto daría evidencia desde diferentes concentraciones, y tal vez de funciones diferenciales dependiendo del lugar de acción de estas. Por ejemplo, DREN_jg5692 = DREN_g999.t1 presenta mayor intensidad en el LPC a diferencia de DREN_jg1272.t1 = DREN_g7721.t1, que presenta mayor intensidad en esófago y en pared corporal. Se cree que una globina monomérica fijadora de oxígeno primitiva es el ancestro común de todas las globinas, un trabajo interesantísimo que queda por realizar es el de poder estudiar estas globinas de nematodos desde un aspecto evolutivo.

También fue abordado en este capítulo el estudio del metabolismo, tanto en un sentido de interés general, como por ejemplo la búsqueda de la vía de la glucólisis; como en particular mediante el estudio de inhibidores de proteasas. La estrategia utilizada para la búsqueda de las distintas vías fue mediante dos flancos. Por un lado, se realizó un trabajo bioinformático, en el cual se buscaron diferentes proteínas en el proteoma predicho a partir del genoma V1 y por otro lado se realizó la búsqueda de las mismas proteínas, en nuestros datos proteómicos generados por espectrometría de masas lo que nos indicaría su expresión en ejemplares adultos de *D. renale*. Como resultado pudimos confirmar que este nematode cuenta con la vía de la glucólisis y gluconeogénesis (ver tabla I, figura 26.4).

Con respecto a la síntesis de lípidos se encuentran las enzimas necesarias para la iniciación de su síntesis a nivel genómico, pero no se encontraron indicios de su expresión. Si bien estas vías de síntesis suelen ser deficientes en helmintos parásitos no puede descartarse su expresión debido a que son muchísimos los factores que pueden llevar a que no sean detectables debido a la técnica utilizada (ver tabla VI, Figura 28.4). En cuanto a la β oxidación, se encontraron, tanto de forma predictiva como en los datos proteómicos, las proteínas necesarias para confirmar que *D. renale* puede degradar lípidos mediante esta vía (ver tabla VII, Figura 29.4).

Desde el punto de vista de obtención de energía la glucólisis es una vía oxidativa universal que puede estar presente como mecanismo fundamental para generar energía tanto en un entorno anaeróbico como aeróbico. Adicionalmente, también fueron encontradas las enzimas de la β -oxidación, vía degradativa que funcionaría estrictamente en presencia de oxígeno. Sumado a este último dato, *D. renale* ha

demostrado contar con la citocromo oxidasa motivo por el cual se puede plantear la hipótesis de que realiza fosforilación oxidativa (ver tabla VIII). En conjunto estos datos dan evidencia de que *D. renale* podría llevar adelante un metabolismo aeróbico.

En un sentido más particular, es decir, relacionado con características que presentan parásitos del clado I como *Trichinella sp*, se puede confirmar que al igual que este último, el nematode *D. renale* no puede realizar el ciclo del glioxilato al no tener una de las proteínas fundamentales para dicho ciclo, como lo es la proteína bifuncional del ciclo del glioxilato (tabla III, ver figura 27.4). La alanino glicosil transferasa que es una proteína que caracteriza al género *Trichinella* por su ausencia, fue encontrada a nivel genómico, pero no en el proteoma (tabla II, figura 27.4). Otra característica que comparten los nematodes del clado I, es la de presentar inhibidores de proteasas del tipo I17 e I2 los cuales podemos asegurar que se expresan en *D. renale*. Son proteínas, que, por su función en relación con la invasión del huésped, resultan muy interesantes como posibles blancos de acción terapéutica. La mayoría de las especies de nematodes, incluida *C. elegans*, poseen un solo miembro de esta familia (24), mientras que en *D. renale* encontramos tres diferentes en nuestro proteoma y doce proteínas diferentes que dan buenos hits de forma predictiva, es decir a nivel genómico (ver tabla de inhibidores de proteínas del tipo I2, tabla IX).

Finalmente, mediante técnicas de citogenética hemos reportado el número de cromosomas para *D. renale* $2n=6$. Este dato es de suma importancia para la anotación y validación del genoma, pero también es evidencia que relaciona a *D. renale* con las otras especies del clado I.

Por lo expuesto anteriormente, es indiscutible la ventaja de contar con datos moleculares integrales como herramienta para abordar el estudio de cualquier organismo, y como nos permite profundizar, en este caso en particular, en el estudio del nematode parásito *D. renale*. Además, permite sentar las bases para una innumerable cantidad de estudios relacionados con este nematode y su clado o de nematodes en general.

Bibliografía

1. Bateman A, Martin MJ, Orchard S, Magrane M, Agivetova R, Ahmad S, et al. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2023 Mar 12];49(D1):D480. Available from: [/pmc/articles/PMC7778908/](https://pmc/articles/PMC7778908/)
2. Franchini GR, Pórfido JL, Ibáñez Shimabukuro M, Rey Burusco MF, Bélgamo JA, Smith BO, et al. The unusual lipid binding proteins of parasitic helminths and their potential roles in parasitism and as therapeutic targets. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* [Internet]. 2015 Feb 1 [cited 2023 Mar 8];93:31–6. Available from: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/34003>
3. Ibáñez-Shimabukuro M, Florencia Rey-Burusco M, Gabrielsen M, Franchini GR, Riboldi-Tunnicliffe A, Roe AJ, et al. Structure and ligand binding of As-p18, an extracellular fatty acid binding protein from the eggs of a parasitic nematode. *Biosci Rep* [Internet]. 2019 Jul 23 [cited 2021 Jul 27];39(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31273060/>
4. Luck AN, Yuan X, Voronin D, Slatko BE, Hamza I, Foster JM. Heme acquisition in the parasitic filarial nematode *Brugia malayi*. *FASEB J* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2023 Mar 13];30(10):3501–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27363426/>
5. Rajagopal A, Rao AU, Amigo J, Tian M, Upadhyay SK, Hall C, et al. Haem homeostasis is regulated by the conserved and concerted functions of HRG-1 proteins. *Nature* [Internet]. 2008 Jun 19 [cited 2023 Mar 13];453(7198):1127–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18418376/>
6. Solovyeva AI, Stefanova VN, Podgornaya OI, Demin SI. Karyotype features of trematode *Himasthla elongata*. *Mol Cytogenet* [Internet]. 2016 Apr 29 [cited 2023 Mar 12];9(1):34–34. Available from: <https://europepmc.org/articles/PMC4850635>
7. Spakulova M, Kralova I, Cutillas C. Studies on the karyotype and gametogenesis in *Trichuris muris*. *J Helminthol* [Internet]. 1994 [cited 2023 Mar 13];68(1):67–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8006389/>
8. Thomas H. Beiträge zur Biologie und mikroskopischen Anatomie von *Trichinella spiralis* (Owen, 1835). *Z Tropenmed Parasitol* 16. 1965;148–80.
9. Geller ER, Gridasova LF, Timonov EV. Karyotype of *Trichinella spiralis* (Owen, 1835). *Proc Third Internat Conf Trichinellosis Miami Beach*. 1972;13–4.

10. Geller ER, Gridasova LF. [Karyotype and ovogenesis of *Trichinella spiralis* (Owen, 1835)]. *Med Parazitol (Mosk)*. 1974;43(3):324–6.
11. Penkova RL, Romanenko LN. The investigation of *Trichinella* chromosomes. . *Trudy VIGIS (in Russian)*. 1973;20:113–42.
12. Mutafova T, Komandarev S. On the karyotype of a laboratory *Trichinella* strain from Bulgaria. *Z Parasitenkd [Internet]*. 1976 Sep [cited 2023 Mar 12];48(3–4):247–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1258525/>
13. Tyanova S, Temu T, Cox J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat Protoc [Internet]*. 2016 Dec 1 [cited 2023 Mar 12];11(12):2301–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27809316/>
14. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods [Internet]*. 2016 Aug 30 [cited 2023 Mar 12];13(9):731–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27348712/>
15. Anderson TA, Levitt DG, Banaszak LJ. The structural basis of lipid interactions in lipovitellin, a soluble lipoprotein. *Structure [Internet]*. 1998 Jul 15 [cited 2023 Mar 12];6(7):895–909. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9687371/>
16. Mann CJ, Anderson TA, Read J, Chester SA, Harrison GB, Köchl S, et al. The structure of vitellogenin provides a molecular model for the assembly and secretion of atherogenic lipoproteins. *J Mol Biol [Internet]*. 1999 Jan 8 [cited 2023 Mar 12];285(1):391–408. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9878414/>
17. Babin PJ, Bogerd J, Kooiman FP, Van Marrewijk WJA, Van Der Horst DJ. Apolipoprotein II/I, apolipoprotein B, vitellogenin, and microsomal triglyceride transfer protein genes are derived from a common ancestor. *J Mol Evol [Internet]*. 1999 [cited 2023 Mar 12];49(1):150–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10368443/>
18. Coghlan A, Tyagi R, Cotton JA, Holroyd N, Rosa BA, Tsai IJ, et al. Comparative genomics of the major parasitic worms. *Nature Genetics* 2018 51:1 [Internet]. 2018 Nov 5 [cited 2023 Mar 12];51(1):163–74. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41588-018-0262-1>
19. Barrett J. *Biochemistry of parasitic helminths*. 1981 [cited 2023 Mar 13];308. Available from: https://books.google.com/books/about/Biochemistry_of_Parasitic_Helminths.html?hl=es&id=XcsgAQAAIAAJ
20. Kanehisa M, Sato Y, Morishima K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. *J Mol Biol [Internet]*. 2016 Feb 22 [cited 2023 Mar 12];428(4):726–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26585406/>
21. Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res [Internet]*. 2016 Jan 1 [cited 2023 Mar 12];44(Database issue):D457. Available from: [/pmc/articles/PMC4702792/](https://pmc/articles/PMC4702792/)

22. Sayers EW, Bolton EE, Brister JR, Canese K, Chan J, Comeau DC, et al. Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2022 Jan 7 [cited 2023 Mar 13];50(D1):D20–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34850941/>
23. Müller HM, Van Auken KM, Li Y, Sternberg PW. Textpresso Central: A customizable platform for searching, text mining, viewing, and curating biomedical literature. *BMC Bioinformatics*. 2018 Mar 9;19(1).
24. Stevens L, Rooke S, Falzon LC, Machuka EM, Momanyi K, Murungi MK, et al. The Genome of *Caenorhabditis bovis*. *Curr Biol* [Internet]. 2020 Mar 23 [cited 2023 Mar 12];30(6):1023-1031.e4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32109387/>

En búsqueda de proteínas específicas

5.1 Estudios de ortología.

5.1 Estudios de ortología

Como se ha descrito en el capítulo cuatro, el uso de herramientas informáticas como lo es el programa Perseus, permitió realizar un análisis general del proteoma. Dicho análisis ha dado lugar al abordaje de conocimientos sobre el metabolismo y la biología de este nematode. No obstante, para poder adecuarnos más a los objetivos planteados para este trabajo de tesis, fue necesario plantear una estrategia para saber cuáles de estas proteínas resultan específicas para *D. renale*. Esto conduciría a poder identificar posibles candidatas para marcadores moleculares específicos y/o nuevos blancos terapéuticos. Para abordar este objetivo, es indispensable realizar un análisis de ortología y evaluar cuales son los genes de *D. renale* que se encuentran emparentados con genes presentes en otras especies y de esta manera poder discriminar cuales genes no cumplen con la condición de especificidad. En este punto es necesario establecer que un gen es considerado ortólogo cuando está presente en diferentes especies que evolucionaron de un ancestro común por especiación (1).

El análisis de ortología fue realizado por el grupo de la Dra. Laura Kamenetzky dentro del proyecto genoma en el cual estamos participando. Dicho análisis se realizó siguiendo la metodología planteada en el trabajo: “El genoma de *Echinococcus canadensis* (G7): un conocimiento clave de las enfermedades humanas causadas por platelmintos parasitarios. p” (2). Puntualmente, para este trabajo se seleccionaron treinta genomas provenientes de distintos organismos representantes de Phyla que conforman el reino animal. Entre los mencionados genomas se encuentra el de *Homo sapiens* y el de *Canis lupus familiaris* que son posibles hospedadores definitivos. Dentro del Phylum

Nematoda se incluyeron los genomas de varios nematodos; entre los cuales se encuentran todos los disponibles para miembros del clado I al que pertenece *D. renale*; algunos nematodos parásitos pero ajenos al clado I y otros como el de *C. elegans* que al tratarse de un organismo modelo presenta un genoma muy confiable desde el punto de vista de su anotación. Además, se sumaron los genomas de otros Phyla como Placozoa, Arthropoda, Platyhelminthes, Cnidaria, Annelida, Porifera, Chordata y Mollusca. Como se mencionó anteriormente, estos organismos cuyos genomas han sido publicados y/o están disponibles en bases de datos de acceso público, delimitaron nuestro análisis de ortología. Esto último implica que existe la posibilidad de encontrar algún gen que no estrictamente cumpla con las asociaciones que se detallan a continuación.

En total, teniendo en cuenta todos los genomas involucrados en el análisis, se pusieron en juego un total de 543711 genes. Dentro de este universo se reconocieron 252 424 como exclusivos del Phylum Nematoda dentro de las cuales 88064 fueron Clado I específicas. Es importante destacar en este punto que se consideraron como específicos todos aquellos genes que aparecían al menos en una de las especies de dichos grupos.

Para el caso de *D. renale* se consideraron 14203 genes; dentro de los cuales 8761 genes no presentaron ortólogos en los genomas analizados dentro del grupo de organismos elegido.

Del resto de los genes de *D. renale*, 3660 presentan ortólogos en especies de nematodos (ver Figura 1.5) mientras que 2081 serían compartidos con otras especies de nuestro análisis. Por otra parte, si restringimos nuestro análisis a los genes clado I específicos podemos decir que *D. renale* presenta 2821 genes compartidos con otros miembros del clado I (*R. culicivorax*, *S. baturini*, *T. spralis* y *T. muris*) de los cuales encontramos

evidencia proteómica para 323 genes (ver Figura 2.5). El conjunto de 8761 genes que son específicos de *D. renale*, podría contener posibles marcadores moleculares específicos (ver Apéndice 6 análisis de ortología). Notablemente, de estos 8761 genes posiblemente específicos se encontró evidencia proteómica para 527, lo cual representa un 6 % del total Figura 3.5. El detalle de cuales fueron dichos genes se encuentra en una tabla anexa 2 adjuntada.

Finalmente, 2620 de los genes estudiados en *D. renale*, presentan ortólogos en todas las especies estudiadas (incluyendo *H. sapiens*).

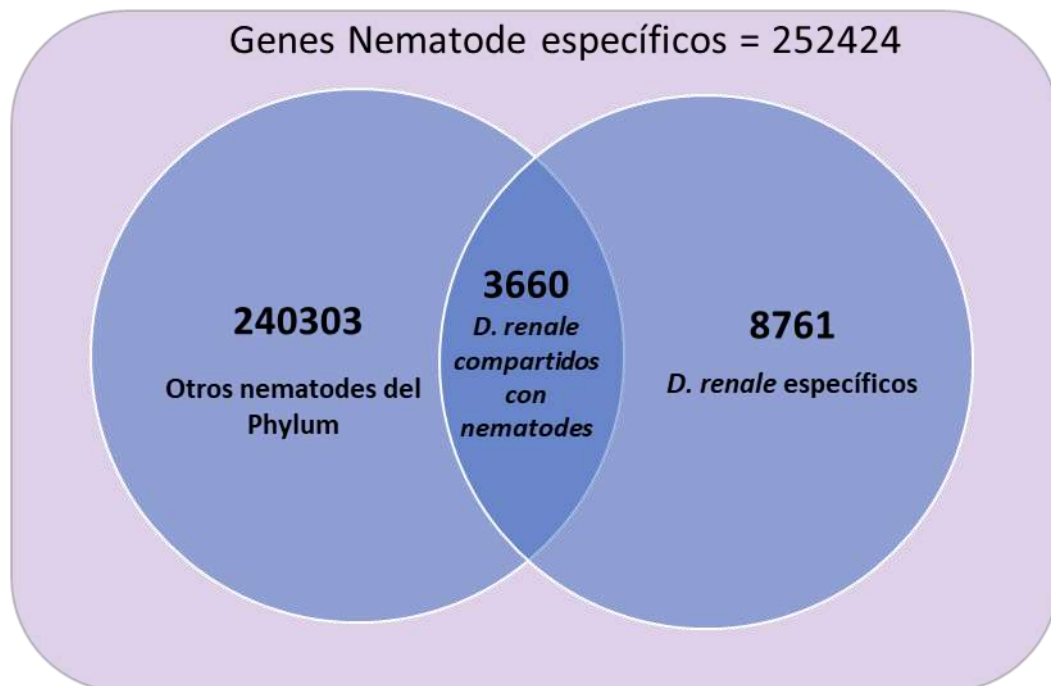


Figura 1.5: Diagrama de Venn, en donde podemos visualizar los genes que son específicos del phylum nematoda, en el círculo de la derecha se incluyen los genes específicos de *D. renale* (8761), en el círculo de la izquierda el resto de los genes que pertenecen al phylum nematoda (240303) y en el centro los genes que *D. renale* comparte con el phylum (3660).

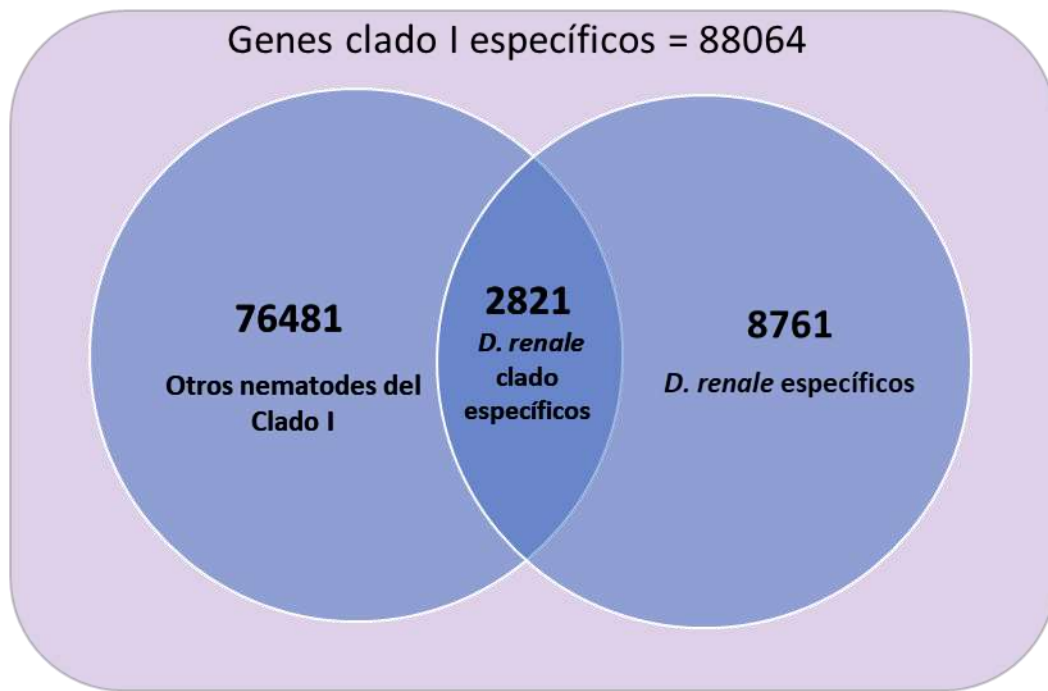


Figura 2.5: Diagrama de Venn, en donde podemos visualizar los genes clado específicos que se ponen en juego en este análisis, en el círculo de la derecha, tenemos los genes específicos de *D. renale* (8761), en el de la izquierda, tenemos genes de nematodos que (dentro de nuestro grupo de estudio) solo se encuentran en el clado I (76481) y en el medio los genes que *D. renale* comparte con los nematodos del clado I (2821), genes que consideramos clado específicos.

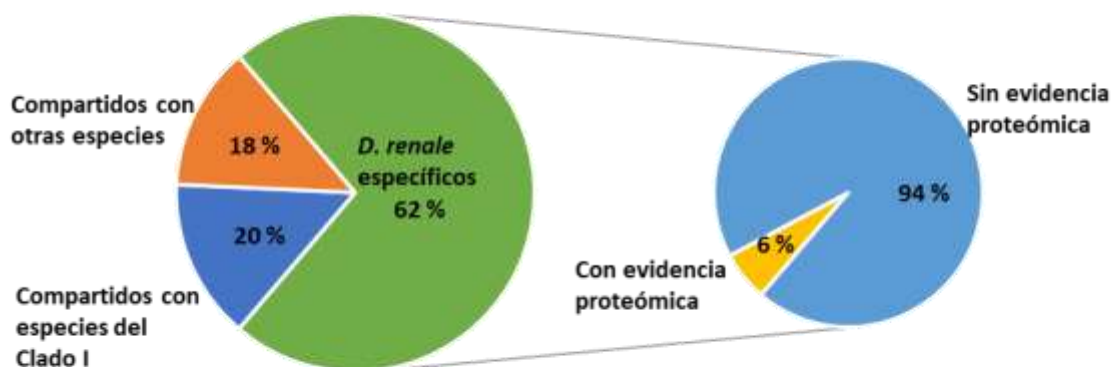


Figura3.5: de todos los genes analizados de *D. renale*, el 62% resulta específicos de dicho nematode. Si analizamos solo los genes específicos de *D. renale*, encontramos que el 6 % tiene evidencia proteómica.

Con los genes que no presentan ortólogos en el grupo de especies estudiada, y que por lo tanto son considerados específicos de *D. renale*, nos quedamos con aquellos para los cuales encontramos evidencia proteómica y utilizamos la base de datos de InterPro2GO para asignar términos de ontología génica (3). Con este último análisis pudimos hacer una lista de proteínas específicas, que nos resultan interesantes a la hora de pensar en marcadores diagnósticos dado que están respaldados por evidencia genómica y proteómica. Contando con los códigos ID de Gene Ontology (“términos GO”) para algunas proteínas de las cuales no encontramos ortólogos, pudimos utilizar el programa gratuito REVIGO (4) el cual nos permite clasificarlas según los términos GO (ver Apéndice 6). Esta última herramienta permitió estudiar rápidamente la lista de proteínas y así plantear de forma hipotética cuales podrían ser posibles marcadores biológicos. Buscamos con marcado interés aquellas proteínas cuyos términos GO indicaran su probable secreción fuera del organismo. Así, nos focalizamos en proteínas que presentaran el termino GO: 0070062, termino asociado a proteínas con posibilidad de pertenecer a exosomas extracelulares y a su vez que también tengan el termino GO: 1903561 que indica asociación a vesículas extracelulares. Encontrar proteínas con estas características nos permite hipotetizarlas como buenas candidatas a marcadores moleculares ya que podríamos encontrarlas si es que son excretadas, por ejemplo, en suero de hospedadores de *D. renale*.

En nuestro análisis encontramos seis proteínas con estas características: DREN_g7891.t1, DREN_g4839.t1, DREN_g6412.t1, DREN_g9284.t1, DREN_jg5509.t1, DREN_jg9428.t1. Si bien hacen falta muchísimo estudio y diferentes experimentos para poder afirmar que estas proteínas pueden funcionar como marcadores diagnósticos,

estos datos y nuestros primeros acercamientos a los datos proteómicos nos permiten dejar esta información a modo de hipótesis posible para que dicho trabajo sea realizado teniendo un punto de partida mucho más sólido. Además, cabe destacar que, de las 527 proteínas consideradas específicas, con evidencia proteómica, solo se asociaron términos GO a 304, el resto no pudo ser clasificada, por lo cual todavía quedan como un importante interrogante ya que podrían surgir proteínas con funciones aun no estudiadas.

Bibliografía

1. BRUSCA R. C., G. J. BRUSCA. Invertebrates. segunda. McGraw Hill, editor. Vol. 2. Madrid; 2005.
2. Maldonado LL, Assis J, Araújo FMG, Salim ACM, Macchiaroli N, Cucher M, et al. The *Echinococcus canadensis* (G7) genome: A key knowledge of parasitic platyhelminth human diseases. BMC Genomics [Internet]. 2018 [cited 2023 Mar 11];18(1). Available from: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/47549>
3. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. Nat Genet [Internet]. 2000 May [cited 2023 Mar 11];25(1):25–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10802651/>
4. Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T. REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. PLoS One [Internet]. 2011 [cited 2023 Mar 11];6(7):e21800. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0021800>

Conclusiones finales

Parte de los objetivos de este trabajo surgieron de una necesidad, ya que como se expone en el primer capítulo, los casos de dioctofimosis en perros de nuestra región no son escasos y los métodos de diagnóstico son poco sensibles o arrojan falsos positivos. La información con la que se contaba sobre este nematode se reducía, prácticamente a una colección de registros de casos y datos morfológicos. Los resultados expuestos en este trabajo de tesis abren un abanico de posibilidades a la hora de abordar esta problemática, además de brindar información valiosa para el estudio de nematodes del clado I y de nematodes en general.

El camino recorrido para lograr los objetivos planteados estuvo lleno de obstáculos, siendo el mayor de todos no contar con datos genómicos del nematode *D. renale*. Esta situación, lejos de desmotivarnos, impulsó el estudio de las proteínas del LPC como se describe en el capítulo dos, donde se logró describir dos proteínas mayoritarias. Por un lado, P44, con capacidad de unión a lípidos e inmunogénica y P17 una nemglobina de color rojo con probable función de unión de oxígeno. Si bien mediante datos de sus secuencias N-terminal y de distintos péptidos se pudo avanzar en su caracterización, los datos genómicos y proteómicos fueron fundamentales a la hora de poder darle

identidad a estas proteínas, determinar con mayor certeza su función y poder ubicarlas taxonómicamente. Finalmente sabemos que ambas son clado específicas.

Por todo lo antedicho se establecieron colaboraciones que sumaron diferentes saberes, y se lograron las herramientas necesarias para poder seguir en el camino planteado. *D. renale* es un nematode parásito con muchas particularidades y miembro de un clado dentro el Phylum que esta poco representado en número de especies y de sus respectivos genomas. Frente a esta situación, obtener un proteoma en ausencia del genoma hubiera sido muy difícil de analizar y con muchas incógnitas por resolver. La obtención del genoma V1 de *D. renale* ha sido sin duda esencial para respaldar nuestros objetivos y poder profundizar en los mismos.

Como se describe en el capítulo tres los ejemplares de *D. renale* de nuestra región presentan diferencias moleculares concretas cuando son comparadas con especies de Asia. Esto claramente podría ser abordado más detalladamente ahora que se dispone del genoma completo mediante el diseño de marcadores génicos específicos.

Finalmente, en los capítulos cuatro y cinco se han resaltado los usos de la información disponible gracias al proteoma. Se plantea de forma hipotética un conjunto de proteínas específicas, con evidencia proteómica que podrían ser parte de vesículas de excreción lo cual las postula como posibles candidatas a buenos marcadores diagnósticos. Por otra parte, se expusieron datos sobre la base del metabolismo del nematode, pudiendo afirmar que presenta vías metabólicas universales como la glucolisis/gluconeogénesis, β -oxidación y fosforilación oxidativa. Adicionalmente, realizando búsquedas basadas en hipótesis particulares, se conoce que existen candidatos para posibles blancos terapéuticos como son los HRGs o las proteínas de unión a lípidos.

Es indiscutible que queda muchísimo trabajo y estudio por realizar en relación con este nematode y su patogenicidad; pero este trabajo de tesis, lejos de tratarse de una conclusión cerrada, representa un sólido un punto de partida para futuros estudios.

Apéndices.

1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE *D. RENALE*.

Los ejemplares de *D. renale* se obtuvieron mediante nefrectomía de perros afectados diagnosticados positivamente mediante ecografías y análisis de huevos en orina pertenecientes a áreas circundantes de la ciudad de La Plata, Argentina (Figura 1.2 capítulo 2).

Estos ejemplares, recién recolectados se lavaron varias veces con solución salina tamponada con fosfato pH 7,4 (PBS) y se colocaron en una placa de Petri. El LPC se obtuvo mediante punción a la altura del esófago, usando agujas de 21G y jeringas de 5 ml estériles (Figura 2.3, capítulo 2), se filtró en esterilidad con tamaño de poro de 0.22 μm y se almacenó a -20°C . El resto de los cuerpos de los parásitos se diseccionaron obteniendo: pared corporal (PC), intestino (I) y gónadas (testículos (T), ovario (G), que se homogeneizaron usando un homogeneizador mecánico manual de tejidos. Todas las muestras fueron conservadas en solución PBS más un cóctel de inhibidores proteasas (Protease Inhibitor Cocktail Set III Calbiochem cat. 539,134, Merck Millipore, San Diego, EE. UU.) y se almacenaron a -20°C . El contenido de proteínas se estimó utilizando el ensayo de Bradford (1).

2 PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE LPC.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Las distintas muestras de proteínas fueron resueltas en geles de poliacrilamida de 1 mm de espesor con una concentración final de acrilamida de 6% para el gel concentrador y 15% para el gel de separador (2). -Utilizando un equipo de electroforesis vertical Miniprotean II (Bio-Rad, Hércules, USA). Las muestras se calentaron a 100 °C, con 5% de β -mercaptoetanol agregado para condiciones reductoras. Después de la electroforesis, los geles se tiñeron en una solución de Coomassie Brilliant Blue R 250 (Sigma-Aldrich, B0770, Saint Louis, EE. UU.), cuya receta es:

Reactivo	(para 100 mL)	Concentración Final
Coomassie Brilliant Blue R-250	0.05 g	0.05%
Methanol	50 mL	50% (v/v)
Ácido acético Glacial	10 mL	10% (v/v)
H ₂ O	100 mL	

Durante la noche se destiñeron usando una solución de etanol al 30% / ácido acético al 10% / agua al 60% v / v / v. Las masas moleculares aparentes se estimaron por movilidad en relación con las proteínas marcadoras estándar (GE Healthcare UK Limited GE; LMW 17–0446-01, Amersham Place, Buckinghamshire, Reino Unido), y se indican en kilodaltons (kDa) (Figura 2.4, capítulo 2).

Cromatografía de exclusión molecular.

La cromatografía de exclusión molecular (CEM) se realizó utilizando un sistema Äkta FPLC (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suecia). Brevemente, se cargaron 400 μ l de LPC filtrado en una columna Superdex 75 HR 10/30 (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suecia) pre-equilibrada con PBS. Se usó una velocidad de flujo de 0.7 ml / min, y las muestras se recolectaron usando un colector de fracciones en línea F900. La columna se pre calibró utilizando albúmina de suero bovino (66 kDa), anhidrasa

carbónica (29 kDa) y citocromo c (12 kDa) como patrones de proteínas en las mismas condiciones de cromatografía, y se realizaron estimaciones del tamaño molecular de las proteínas como describe Uversky VN (3). Las muestras, así como las proteínas estándar, se analizaron dos veces en las mismas condiciones para garantizar la reproducibilidad. Los perfiles de elución se registraron después de la absorción UV a 215 y 280 nm.

Cromatografía en fase reversa (rp-HPLC): separación de los ligandos de las proteínas P44 y P17.

La remoción de los ligandos lipídicos unidos a las proteínas constituye un paso fundamental en la purificación y es clave para el éxito de los ensayos realizados para caracterizar la unión de la proteína a distintas sondas fluorescentes como DAUDA o ANS, y su posible desplazamiento con ácido oleico. Por lo que se procedió a deslipidizar por HPLC en fase reversa (del inglés High Performance Liquid Chromatography). La fase estacionaria consiste en una matriz de sílica derivatizada con moléculas hidrofóbicas de determinado número de carbonos. La fase móvil es un sistema de solventes en gradiente de polaridad decreciente. La proteína se desnaturaliza y mediante sus regiones hidrofóbicas expuestas es retenida en la columna, al igual que los lípidos que pudiera contener. Ambos tipos de compuestos eluyen en distintas regiones del gradiente permitiendo su separación. Como fase estacionaria se utilizó una columna C8 BioWide (Supelco). Para la fase móvil se usó un gradiente mezclando los solventes A (H₂O+TFA 0.1%) y B (ACN+TFA 0.1%), a un flujo de 0.7 ml/min. Las muestras fueron detectadas a una longitud de onda de 280 nm usando el detector UV-VIS MERCK-HITACHI L4200 (TFA: Acido trifluoroacético, ACN: Acetonitrilo).

Gradiente:

- Solución A: H₂O+TFA 0.1%
- Solución B: ACN+TFA 0. 1%

Tiempo (min: seg)	Flujo (nl/min)	%B
00:50	0.7	10-30
00:13	0.7	30-70
00:20	0.7	70-100
00:05	0.7	100

En la Figura A1 se puede observar un cromatograma de HPLC para P44 obtenido por seguimiento a 280 nm en función del tiempo de elución.

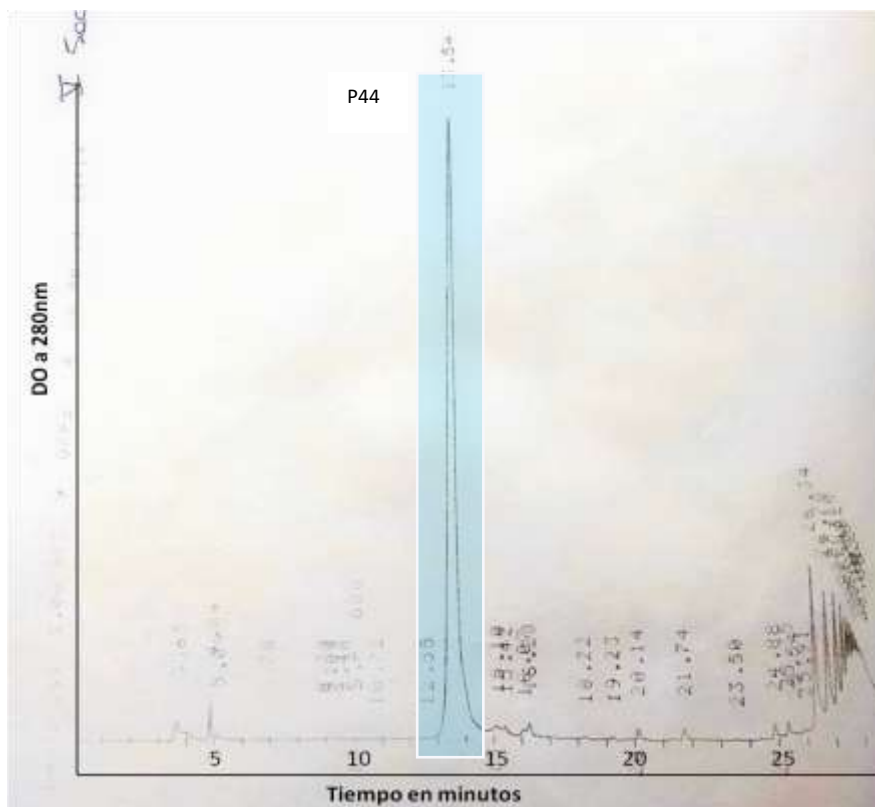


Figura A1 Cromatograma de HPLC por seguimiento de la DO a 280 nm en función del tiempo de elución. Se observa la presencia de un pico mayoritario correspondiente a la proteína P44.

Así como resultó sumamente necesario deslipidizar P44 para poder evaluar su posible capacidad de unión a lípidos, resultó necesario separar la proteína P17 de su ligando. Esto nos permitió, por un lado, el estudio de la naturaleza del enlace entre P17 y un posible grupo hemo, y por el otro, confirmar la identidad del ligando. Para ello se procedió pasando la fracción post exclusión molecular que contenía P17 en forma nativa por una HPLC- fase reversa de la misma forma y bajo las mismas condiciones que para P44. El resultado arrojó dos picos principales, el primero corresponde a la proteína y el segundo, de color rojo-marrón corresponde a su ligando.

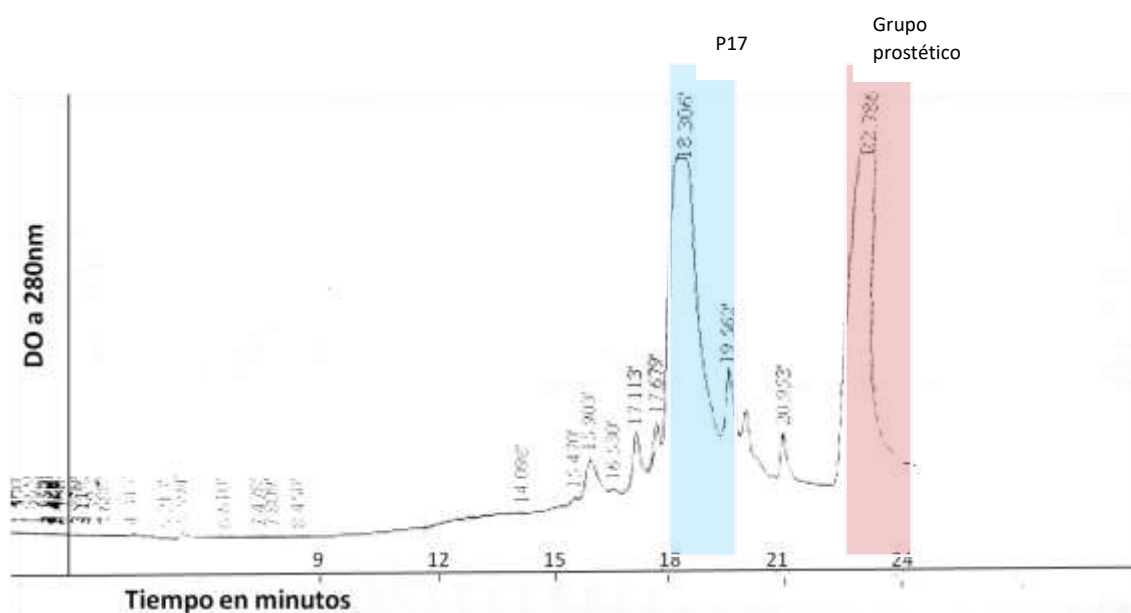


Figura A2 Cromatograma de HPLC por seguimiento de la DO a 280nm en función del tiempo de elución. Se observa la presencia de dos picos mayoritarios el primero correspondiente a la proteína P17 y el segundo a su ligando.

Liofilización.

Luego de la cromatografía HPLC en fase reversa, las fracciones correspondientes a las proteínas P44 y P17 se transfirieron a un tubo Falcon de 50 ml. Se liofilizaron hasta sublimación completa de los solventes y se resuspendieron en agua milli Q filtrada. Se ajustó el pH agregando bicarbonato de amonio 1M y se filtraron con filtros de ultracentrífuga marca Merk, de 15 ml y corte de 10000 Da, para asegurar la total remoción de TFA y aumentar su concentración. Luego, usando los mismos filtros se pasaron a PBS. En el caso de la fracción que contenía el posible grupo prostético de P17, como esta resulta insoluble en agua, se resuspendió agregando ETOH absoluto hasta observar la resuspensión del precipitado.

Dicroísmo circular.

Los espectros se registraron en un espectropolarímetro Jasco J-810. Los datos en las regiones del UV cercano (250–320 nm) o del UV lejano (200–250 nm) se recopilaban utilizando cubetas de paso óptico de 10 mm o 1 mm, respectivamente. Se utilizó una velocidad de escaneo de 20 nm/min con una constante de tiempo de 1 s. Cada espectro se midió al menos tres veces y los datos se promediaron para reducir el ruido. Los datos se presentan como elipticidad en función de nm dado que al momento no se contaba con la secuencia de las proteínas en cuestión (4).

Actividad de unión a lípidos en geles de poliacrilamida nativos.

Para identificar las proteínas de unión a lípidos presentes en el LPC, las muestras se preincubaron con la sonda fluorescente sensible al ambiente 11- [5- (dimetilamino) -1-naftalenosulfonilamino] ácido undecanoico (DAUDA, Invitrogen Molecular Probes, Eugene, USA). Se añadió 1 µl de una solución DAUDA 60 µM a 20 µl de LPC cuya concentración de proteínas es 6-10 µg / µl y se incubó durante 30 minutos a 20 ° C. Como control positivo, se incluyó ABA-1A recombinante de *Ascaris suum*, una proteína que une ácidos grasos y retinol muy bien caracterizada en nuestro laboratorio (5–7). Las muestras pre-incubadas con DAUDA se resolvieron en geles al 15% sin adición de SDS, agente reductor o calentamiento. Sin ninguna otra tinción, se visualizó la emisión de fluorescencia utilizando el equipo Image Quant 350 (28–9272-95, GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suecia), utilizando la luz UV como fuente de luz de excitación y un conjunto de filtros de fluoresceína (537/35 nm) para detección de emisiones. Después de capturar la imagen de fluorescencia, se realizó una etapa final de tinción de gel con Coomassie Brilliant Blue R en el mismo gel (ver Figura 10.2 capítulo 2).

Extracción y análisis de lípidos unidos a proteínas.

Se extrajeron los lípidos totales a partir de LPC o de proteínas purificadas como se describió en los trabajos de XIA Y. (2000) y Floch J. (1957) (8,9). Las fracciones de LPC o proteína (0,5 ml) se mezclaron con 5 ml de CHCl_3 : CH_3OH (2: 1 v / v) y se agitaron vigorosamente durante 15 minutos en un baño de hielo. El homogeneizado se almacenó durante la noche a -20°C y al día siguiente se añadieron 250 μl de solución de NaCl al 2,9% p / v y se agitó en vórtex. Las fases acuosa y solvente se dejaron separar a temperatura ambiente y también mediante un ciclo de centrifugación (1000 xg) durante 10 minutos. La fase acuosa superior se desechó y la fase inferior que contenía lípidos se recuperó y se secó bajo una corriente de gas nitrógeno, se redisolvió en CHCl_3 y se almacenó a -20°C . Las clases de lípidos que se encuentran en las muestras de LPC se resolvieron mediante cromatografía en capa fina (TLC) utilizando métodos y sistemas de solventes descritos previamente por Folch (9). Las muestras de lípidos obtenidas de LPC junto con los patrones de lípidos se detectaron en placas de TLC (20 x 20 cm; previamente activadas a 100°C durante 30 min) y se desarrollaron con acetato de metilo / isopropanol / cloroformo / metanol / 0.25% KCl (25:25: 25: 10: 9, en volumen) para lípidos polares. Un concentrado de lípidos de hígado de rata previamente obtenidos en nuestro laboratorio se incluyó como referencia. Las placas se revelaron utilizando el método de carbonización con ácido sulfúrico. Brevemente, las placas se rociaron con una solución de CuSO_4 al 8% (p / v) y H_3PO_4 al 10% (v / v); los lípidos se visualizaron como depósitos de carbón negro formados después de calentar las placas a 180°C durante 15 minutos.

Espectrofluorimetría.

Los experimentos de fluorescencia se realizaron con un espectrofluorómetro Fluorolog-3 (Horiba-Jobin Yvon, Edison, NJ). Se utilizaron dos sondas de fluorescencia sensibles al ambiente, la sonda hidrofóbica no específica ácido 8-anilinaftaleno-1-sulfónico (ANS) y el análogo de ácido graso DAUDA; descrito en la sección Actividad de unión a lípidos en geles de poliacrilamida nativos. Se considera que este último es el más selectivo de los sitios de unión de ácidos grasos ubicados en las proteínas y se utiliza el espectro de emisión de fluorescencia de su fluoruro de dansilo para indicar el grado de apolaridad de su entorno (10).

Las soluciones madre de DAUDA se prepararon en etanol y luego se diluyeron en PBS para su uso en los ensayos. Después de la purificación por CEM, P44 se deslipidizó utilizando el protocolo de HPLC de fase reversa que se describió anteriormente (5,10) y se empleó en todos los experimentos de unión a ligandos. Los espectros de proteínas incubadas en presencia de DAUDA se registraron usando $\lambda_{exc} = 345$ nm y la emisión fue tomada en el rango $\lambda_{em} = 360$ -650 nm. Para ANS, la longitud de onda de excitación fue $\lambda_{exc} = 350$ nm y la emisión de fluorescencia se recogió en el rango de $\lambda_{em} = 420$ - 600 nm. La fluorescencia intrínseca de la proteína se midió en presencia y ausencia de ácido oleico, la longitud de onda de excitación se ajustó a $\lambda_{exc} = 295$ nm y la emisión se recogió en el rango de $\lambda_{em} = 310$ -400 nm.

Para realizar los ensayos de desplazamiento de DAUDA con ácido oleico, se incubaron P44: DAUDA en una relación 1:5 aproximadamente. A continuación, se tomó el espectro de emisión observándose el aumento dramático en la intensidad de fluorescencia sumado a un cambio hacia el azul en la posición del máximo de emisión de DAUDA (desde 544 nm a 470 nm). Este espectro inicial se revirtió con adiciones sucesivas de 0,5

μl de ácido oleico 1 mM. Experimentos similares con P17 de *D. renale* revelaron que no hay unión de DAUDA. En todos los casos anteriores, los anchos de hendidura (slit width) se ajustaron a 5 nm tanto para la excitación como para la emisión. Todos los espectros de emisión se trazaron y analizaron usando el software Microcal ORIGIN.

Espectrometría de masas de proteínas y secuenciación de aminoácidos N-terminal.

Los análisis de espectrometría de masas y la secuenciación N-terminal se llevaron a cabo en el Laboratorio Nacional de Investigación de Péptidos y Proteínas (LANAIS PROEM, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires) en un espectrómetro de masas MALDI TOF TOF 4800 plus (ABSciex, Framingham, MA). La secuenciación N-terminal se realizó en un PPSQ-31A (Shimadzu Corporation, Japón). La secuenciación directa N-terminal por degradación de Edman proporcionó secuencias para 18 y 19 aminoácidos para P17 y P44, respectivamente. Para P44, se obtuvieron péptidos adicionales luego de la digestión con tripsina, proteinasa Glu-C o proteinasa Lys-C.

Análisis de la reversibilidad de la unión del ligando a P17.

Se evaluó la capacidad de P17 de volver a unir su ligando luego de ser separado por HPLC fase reversa. Este análisis se llevó adelante utilizando geles nativos de poliacrilamida de 1 mm espesor, 15% de acrilamida y sin adición de SDS, agente reductor o calentamiento de las muestras. A continuación, se tomó la fracción correspondiente al ligando, y se liofilizó (ver Capítulo 2) pero en esta oportunidad se resuspendió parte del precipitado rojo directamente con 15 μl de P17 en PBS resultante de la misma purificación. La otra parte del precipitado se resuspendió con albúmina (15μl, 1 mg/ml en PBS) para tener un

control negativo. También corrimos en el gel nativo LPC como control de la proteína P17 antes del tratamiento (sembramos 4µl de una concentración de 12.4 µgr/µl). Las muestras que se corrieron fueron: LPC, albúmina, P17, albúmina + grupo hemo, P17 + grupo hemo (ver Figura 14.2, capítulo2).

Análisis de la unión de hemina comercial con la P17.

Para realizar este ensayo se pesaron 1,1 mg de hemina (marca SIGMA código 51280) y se disolvieron en 50 µl de NaOH 0.1N, luego, se llevó a 1.8 ml con agua milli Q. Se midió la concentración de la fracción de proteína apo P17 (sin su ligando) por el método Bradford (1) dando como resultado 126 µM. Se plantearon las siguientes relaciones de proteína ligando: 1:0.5; 1:1; 1:2 y 1:4 y con exceso de hemina. Se realizó una corrida electroforética en gel nativo de acuerdo al detalle de la sección anterior (Análisis de la reversibilidad de la unión del ligando a la P17).

3 INMUNOENSAYOS

Las muestras analizadas en los inmunoensayos fueron: LPC completo, P44 y P17 purificadas y homogenato de esófago. La obtención y preparación de LPC, P44 y P17, se detalló anteriormente. La preparación del homogenato de esófago se reprodujo tal cual a la técnica desarrollada por la Dra. Daniela Pedrassani (11). Como controles negativos, fueron utilizadas muestras de suero de perros de Jaboticabal (SP), región no endémica para *D. renale*, y como control positivo fueron sueros de perro infectados naturalmente.

Las muestras sanguíneas fueron obtenidas por venopunción yugular, se utilizaron tubos de 3 ml. La sangre fue inmediatamente centrifugada para la separación de suero, los sueros fueron alicuotados y mantenidos a -20°C. Es importante destacar que la práctica de tomar sueros fue realizada por médicos veterinarios.

-Inmunoensayo desarrollado para la detección de IgG de perro anti-*Dioctophyme renale*.

El protocolo utilizado fue el mismo usado por Daniela Pedrassani en su trabajo de tesis doctoral(11). El antígeno soluble obtenido fue diluido en buffer carbonato-bicarbonato de sodio 0,05M pH 9,6, llegando a la concentración de 5 µg/mL. En cada pozo de la placa (Nunclon, Cat no167008) se sensibilizó con 100 µL del antígeno soluble, luego se incubó por 12 a 14 horas, a 4°C, en cámara húmeda. La placa fue lavada tres veces con PBS 0,01M pH=7,4 0,05% Tween (PBST). El bloqueo de los pozos fue realizado con 200µL de buffer carbonato-bicarbonato de sodio 0,05M pH=9,6, adicionado de 2% o 6% de leche en polvo descremada, por 90 minutos, a 37°C. El exceso de bloqueo fue removido por tres lavados con PBST.

Las muestras de sueros positivas y negativas para dirofilariosis fueron diluidas (1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1.600 e 1/3.200 veces) en PBST con 2% o 6% de leche en polvo descremada, para bloquear reacciones inespecíficas. A cada pozo se le adicionó 100 µL de suero diluido. Las placas fueron incubadas por 90 minutos a 37 °C, en estufa, y luego lavadas tres veces con PBST.

El conjugado que se utilizó fue IgG de conejo anti-IgG de perro, conjugado con peroxidasa (Sigma cat no A6792). Este fue diluido en PBST con 5% leche en polvo descremada usando las siguientes diluciones 1/5.000 y 1/7.000. Se aplicaron 100 µL por pozo, la placa fue incubada, por 90 minutos, a 37°C, y lavada como ya se describió.

El sustrato para la enzima peroxidasa fue ortofenilendiamina - OPD (Sigma cat no P6787) en una concentración de 20 µg con 0,02% de peróxido de hidrógeno, en buffer citrato pH=5,0. Fueron adicionados 100 µL de solución de sustrato por pozo, inmediatamente las placas fueron mantenidas a temperatura ambiente en oscuridad por 15 minutos, para el revelado. La reacción se frenó por adición de 5 µL de ácido sulfúrico 2% por pozo. Los valores de absorbancia fueron obtenidos utilizando un lector de microplacas de ELISA (Microplate Reader MRX TC Plus, Dynex Technology) con filtro de 490 nm.

Técnica de dot blot.

Para realizar el dot blot, se cortó una membrana de PVDF con una saca ojalillo y se colocó en pozo de placa de ELISA, usando las mismas muestras preparadas para el ELISA, sembrando 2 µl por ojalillo. Luego se bloqueó con PBS 1x - leche 5 % toda la noche, se lavó tres veces con PBST y se incubó con 200 µl de suero positivo para Dirofilariosis en una dilución 1/100; se lavó tres veces con PBST y se incubó con 200 µl del anticuerpo

secundario anti IgG de perro conjugado para FAL-SIGMA en una dilución 1/2000; se incubó 1:30 hs en oscuridad y se lavó tres veces con PBS- Tween, luego se adiciono el sustrato (BCIP/NBT de BIORAD) aplicando 200 µl por pozo a los tres minutos ya se vio color, se lavó con agua destilada suavemente.

Técnica de Western blot.

Las muestras se hirvieron en buffer de carga con SDS (receta del buffer de carga: 380mgr de Tris, 5ml de Glicerol, 0.1 gr de SDS, 22.5 ml de beta mercapto etanol, 1 mgr de azul de bromo fenol, llevar a 10 ml con agua bidestilada), y se separaron en gel de poliacrilamida 15% como se describió anteriormente. Se sembraron 40 ml de las muestras de LPC del gusano adulto y de P44 purificada (la concentración de las proteínas fue medida mediante Bradford(1)). Seguidamente se transfirió a membrana PVDF (Millipore) por electro transferencia. Los sueros positivos y negativos para Dioctofimosis se diluyeron 1:5000 en PBST y se incubó con la membrana 2 hs. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG-HRP de perro (SIGMA) en una dilución 1:5000 en PBST. El revelado se realizó en cámara oscura utilizando un cassette de revelado en el cual se expuso la placa fotográfica frente a la membrana durante 10 minutos y se reveló utilizando revelador G150 y fijador marca Carestream.

4 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Extracción, amplificación por PCR y secuenciación de ADN.

Muestras de ADN de *D. renale*

En aquellos casos donde el gusano estaba entero o una pieza en EtOH al 70 %, se cortó un segmento de entre 0,5 y 1 cm, preferiblemente del tercio anterior del cuerpo del animal, esto se hace con la intención de preservar las porciones de la cabeza y la cola del ejemplar para su ubicación en el museo e identificarlo morfológicamente. Dicho segmento era colocado en un mortero pre-enfriado y se volcaba nitrógeno líquido encima. Luego de que se evaporara el nitrógeno, se trituraba hasta su reducción a polvo y se pasaba con espátula estéril a tubo estéril de 1,5 ml. Paso siguiente se siguieron las instrucciones del kit DNAeasy® Blood & Tissue Handbook Kit. Mediante el uso de este Kit pudo realizar una extracción limpia de ADN a partir de todas muestras analizadas.

Amplificación mediante PCR.

La secuencia *cox I* de *D. renale* que se utilizó para amplificar se extrajo de GenBank: acceso a GenBank número EU394733 (12). Se utilizaron los primers *coxI* (DRCOX76F, 5'-TGGTGTGCTTGGTTGTTTTG-3'; DRCOX214R, 5'-AACCTGCCCACCATACAAAG-3'), de acuerdo a Tokiwa et al. (13) Las condiciones de amplificación que se utilizaron fueron: desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 1 min, hibridación a 50 °C por 1 min, y extensión a 72 °C por 1 min, luego de una última extensión a 72 °C

durante 10 min. Los productos amplificados fueron secuenciados y tipificados por análisis de SNPs en MacroGen (Korea).

Métodos utilizados para el armado de los árboles evolutivos.

El análisis evolutivo se realizó por el método de Máxima Verosimilitud y el modelo Reversible de Tiempo General (14). Se muestra el árbol con la mayor verosimilitud logarítmica (-129,78). El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agruparon se muestra junto a las ramas. Los árboles iniciales para la búsqueda se obtuvieron automáticamente mediante la aplicación de los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el enfoque de Máxima Verosimilitud Compuesta (MCL), y luego seleccionando la topología con valor de verosimilitud superior. Se utilizó una distribución Gamma discreta para modelar las diferencias de tasas evolutivas entre sitios (5 categorías (+G, parámetro = 200,0000)). El modelo de variación de tasas permitió que algunos sitios fueran evolutivamente invariables ([+I], 0.00% de sitios). El árbol está dibujado a escala, con las longitudes de las ramas medidas en número de sustituciones por sitio. Este análisis involucró 13 secuencias de nucleótidos. Hubo un total de 75 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X (15).

5 BÚSQUEDA DEL NÚMERO DE CROMOSOMAS DE *D. RENALE*

Preparación de la muestra para microscopía.

Los nematodos se aislaron mediante nefrectomía de perros diagnosticados con Dioctofimosis en áreas circundantes de la ciudad de La Plata, Argentina. Los parásitos recién recolectados se lavaron varias veces con PBS y se colocaron en una placa de Petri. Se hizo una pequeña incisión cerca del extremo anterior de los gusanos adultos usando un bisturí estéril y se extrajo la gónada (se puede visualizar la gónada a través de la pared de *D. renale* en la Figura A3) tanto de machos como hembras, inmediatamente fueron sumergidas en una solución hipotónica KCl 0,56% durante 40 minutos y luego fijadas en Carnoy (etanol: ácido acético glacial (3:1)). Se eligió gónada como tejido de estudio ya que presenta tanto mitosis como meiosis y en una tasa más alta que el resto de los tejidos.

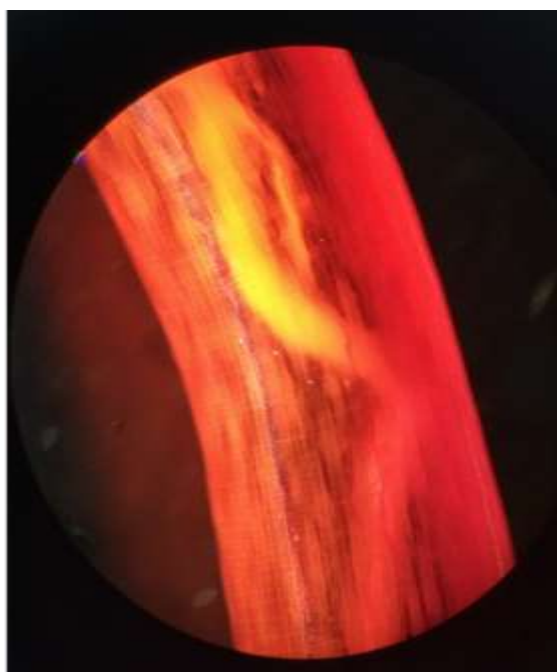


Figura A3: porción del cuerpo de *D. renale* donde se observa en su interior una porción de gónada. Fotografía tomada con lupa marca Leica M60.

Para la coloración de cromosomas se colocó una porción de gónada con una gota de Orceína acética en un portaobjeto, y se homogeneizó el preparado por aplastamiento. El “squash” convencional (16) o aplastado, se realizó entre el porta y el cubreobjetos, apretando con los dedos, para así dispersar el material. Las placas obtenidas fueron selladas con esmalte de uñas para una mayor preservación de la muestra. Los preparados se observaron utilizando un microscopio Olympus BX51 con cámara DP71 con las cuales se tomaron las fotografías (Figuras 7.4-9.4, capítulo 4).

6 PROTEÓMICA:

Validación de anotación de proteínas y análisis de la calidad del genoma de *D. renale*.

La estrategia que se utilizó fue primero generar un multiFASTA a partir de las bases de datos públicas disponibles, de las secuencias de proteínas de interés. Por ejemplo, proteínas/enzimas responsables de la síntesis del grupo Hemo. Luego se las buscó en el proteoma predicho a partir del genoma de *D. renale*. Con estas secuencias obtenidas se realizó un BLAST-Precíproco en bases de datos (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, Uniprot, <https://www.uniprot.org/>, wormbase parasite <https://www.wormbase.org/>), para confirmar la identidad de las proteínas.

Para generar los archivos multiFASTAs y así realizar las diferentes búsquedas se utilizaron diferentes criterios según el grupo de proteínas a estudiar cómo se detalla a continuación:

Selección de FABPs para generar archivo multiFASTA

Primero se generó un multiFASTA con secuencias obtenidas de GenBank del NCBI de FABPs de rata (17), con esta lista de FABPs de rata se realizó un PSI-BLAST (con tres búsquedas consecutivas) para seleccionar FABPs de nematodos. El resultado de la búsqueda anterior arrojó un número altísimo de FABPs de nematodos, de las cuales se seleccionaron solo las que tenían entre 100 y 180 aa.

Búsqueda de proteínas de la vía de síntesis de grupo Hemo

Para la siguiente búsqueda se tomó la misma estrategia utilizado por Rao et al., 2005 (18). Brevemente, en dicho trabajo se realiza un análisis de las bases de datos de genomas de gusanos disponibles públicamente que les reveló la ausencia de ortólogos obvios para las enzimas de la vía de biosíntesis del hemo. Para esto consultaron las bases de datos del genoma mediante el uso de secuencias de enzimas humanas que catalizan los siete pasos secuenciales para sintetizar hemo a partir del primer precursor universal, el ácido δ -aminolevulínico. Estas enzimas fueron: ALAD, ácido d-aminolevulínico deshidratasa (AY319481); PBGD, porfobilinógeno desaminasa (NM_000190); UROS, uroporfirinógeno III sintasa (BC002573); UROD, uroporfirinógeno descarboxilasa (CR456976); CPOX, coproporfirinógeno oxidasa (NM_000097); PPOX, protoporfirinógeno oxidasa (NM_000309); FC, ferroquelatasa (BC039841).

Búsqueda de proteínas sensibles al grupo Hemo (HRG)

Basándonos en el trabajo realizado por Luck A. et al 2016: donde utilizan para diferentes análisis y comparaciones ortólogos de HRGs encontrados en *C. elegans* (19). A partir de esto se generó un multiFASTA a partir de todas los HRGs de *C. elegans* encontradas en la Wormbase (<https://www.wormbase.org>).

Obtención de homogenatos provenientes de diferentes tejidos para análisis proteómico.

Los ejemplares de *D. renale*, obtenidos a partir de perros naturalmente infectados, se lavaron tres veces con PBS estéril. Luego fueron colectadas las siguientes muestras de tejidos: LPC, pared corporal, aparato digestivo, gónada y esófago de nematodes machos y hembras por triplicado haciendo un total de 30 muestras.

El LPC se obtiene mediante punción a la altura del esófago, usando agujas de 21G y jeringas de 5 ml estériles. Una vez colectado el LPC, con una lámina de bisturí estéril se corta al nivel de la unión del esófago con el tubo digestivo y se retira el esófago de la cabeza. De la sección opuesta del cuerpo del nematode (es decir la sección remanente sin la cabeza) se retirarán de 2 a 3 cm de tubo digestivo. Finalmente, del extremo caudal del nematode se corta la cola para poder retirar de 2 a 3 cm de gónada. De la extremidad roma que queda del cuerpo se cortan de 2 a 3 cm de pared corporal.

A medida que se obtienen los distintos fragmentos de tejido, son colocados inmediatamente en hielo, en tubos previamente rotulados. Cada tejido es lavado con PBS estéril tres veces y luego sumergido en inhibidor de proteasas (cOmplete™ ULTRA Tablets, glass vials Protease Inhibitor Cocktail. Roche).

En el siguiente paso se disgregaron hasta obtener una solución homogénea, con un homogeneizador manual de vidrio. La concentración final de proteínas de cada tejido se calculó mediante la técnica de Bradford. Una vez calculada la concentración proteica de cada muestra, se evaluó su calidad mediante una corrida en SDS-PAGE (ver Figura A 4)

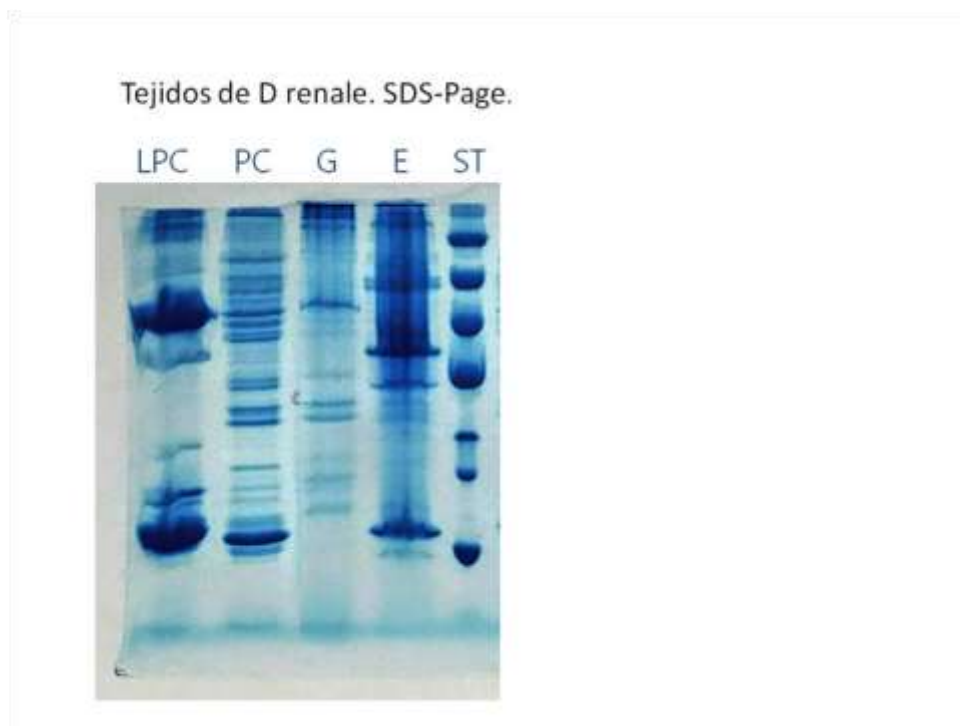


Figura A 4: Gel de poliacrilamida 15% donde se observan los perfiles proteicos de los diferentes homogenatos de tejidos. LPC: líquido pseudocelómico, PC: pared corporal, G: gónada y E: esófago.

Tratamiento de las muestras para espectrometría de Masa.

Las muestras se corrieron en gel de poliacrilamida 15% dejando que avancen luego de su siembra solo 3 cm. De esta manera queda una banda ancha conteniendo todas las proteínas de cada tejido, luego se cortó el gel con bisturí estéril y fueron colocados en tubos Eppendorf. Las muestras fueron enviadas al Centro de Estudios Químicos y Biológicos en Espectrometría de Masa (CEQUIBIEM, CONICET, UBA).

Procedimiento en el CEQUIBIEM:

Las muestras fueron reducidas con DTT 20 mM durante 45 minutos a 56 grados y alquiladas con Iodoacetamida 20 mM durante 45 minutos en oscuridad. Se digirió con tripsina (corta a la derecha de Lys y Arg) durante toda la noche. Se realizó la extracción

de los péptidos con acetonitrilo. A continuación, las muestras fueron secadas por Speed Vac y vueltas a resuspender con 10 µl de Ácido Fórmico 0,1%. Las muestras se analizaron por nano HPLC acoplado a un espectrómetro de masa con tecnología Orbitrap, lo que permite en primer lugar una separación de los péptidos obtenidos por digestión trípica de la muestra y una posterior identificación de los mismos. La ionización de las muestras se realiza por electrospray. El análisis de los datos obtenidos se realiza con el programa Proteome Discoverer.

Configuración del equipo:

Cromatógrafo: Se utilizó un cromatógrafo marca Thermo Scientific, modelo EASY-nLC 1000 apto para separar complejos proteicos con un alto grado de resolución utilizando una columna de fase reversa.

Columna Marca: Thermo Scientific Modelo: EASY-Spray Accucore (P/N ES801)

Características: C18, 2 m, 100^Å, 75 µm x 150 mm Temperatura: 35°C Pre- Columna Marca:

Thermo Scientific Modelo: Acclaim PepMap (P/N 164946) Características: C18, 3 m, 100^Å, 75 µm x 20mm.

Gradiente Se utiliza un gradiente con dos soluciones:

- Solución A: Agua con 0,1% de Ácido Fórmico
- Solución B: Acetonitrilo con 0,1 de Ácido Fórmico

Todos los solventes y reactivos utilizados son de calidad LC-MS.

Tiempo (min: seg)	Duración (min: seg)	Flujo (nl/min)	%B
00:00	N/A	300	5
110:00	110:00	300	35
111:00	1:00	300	95
120:00	09:00	300	95

Volumen de inyección: 2 ml

Ionizador: Se utilizó un ionizador por Electro Spray marca Thermo Scientific, modelo EASY-SPRAY.

Voltaje del Spray: 3,5 kV

Espectrómetro de masa: Se utilizó un espectrómetro marca Thermo Scientific, modelo Q-Exactive. El equipo cuenta con una celda de HCD (High Collision Dissociation) y un analizador Orbitrap. La configuración del equipo permite que la identificación de los péptidos se realice al mismo tiempo que los mismos se separan por cromatografía, obteniendo Full MS y MSMS. Se utilizó un método que realiza la mayor cantidad de ciclos de medición por unidad de tiempo. La duración del ciclo depende de la resolución utilizada. En cada ciclo el equipo hace un Full MS y luego hace MSMS a los 12 picos de mejor señal ruido en ese ciclo, con un rango de exclusión dinámico para disminuir el número de veces que un mismo péptido es fragmentado a lo largo de su elución del cromatograma.

Análisis de Datos:

Los espectros obtenidos son analizados con el programa Proteome Discoverer, utilizando la base de datos correspondiente al estudio en cuestión.

Proteome Discoverer: Thermo Scientific Versión: 1.4. Es un motor de búsqueda en el cual el usuario debe seleccionar la base de datos y ciertas características que se vinculan con la forma en que fue tratada la muestra. En base a esta información y a los datos crudos obtenidos del espectrómetro de masa, el programa desarrolla un informe donde indica que proteínas fueron identificadas y los péptidos que utilizó para esta identificación. El programa asigna un nivel de confianza a estos péptidos (High/Medium/Low) y el usuario decide con cuál nivel de confianza trabajar, siendo siempre preferible utilizar solo los péptidos de nivel High.

Criterios de búsqueda: genoma V1 de *Diocetophyme renale*.

Análisis estadístico por pasos en Perseus 1.6.15.

Para arrancar el análisis de los datos de proteómica primero es necesario hacer una limpieza de datos que nos interesan, nombrarlos y ordenarlos según nuestro objetivo.

En este sentido, primero se filtró para excluir las proteínas identificadas por sitio, las que coincidan con la base de datos inversa o los contaminantes. Luego se transformaron los datos a una escala logarítmica especificando la función de transformación $\log_2(x)$ y se realizó un análisis exploratorio, en el cual se inspeccionaron visualmente los datos. Para esto tomamos provecho de la visualización de los datos mediante histogramas y gráficos de dispersión múltiple.

A continuación, se comenzó con el diseño experimental, para lo cual se definieron distintos grupos de proteínas de acuerdo al tejido al que pertenecían, según el sexo del nematode y un tercer grupo según tejido y sexo juntos. Estos grupos nos permitieron realizar gráficos de volcán y así evaluar rápidamente si dentro de las réplicas se encuentran proteínas de interés, además de comparar los diferentes grupos entre sí y visualizar que proteínas son más significativas para cada uno de ellos. Para graficarlos elegimos en el eje X la diferencia entre muestras (Student T-test Difference A_B) y en el correspondiente el eje Y el $-\text{Log p-value}$ ($-\text{Log Student T-test p-value A_B}$) Volcano Plot siguiendo la ecuación correspondiente a un valor de p igual a 0.05 pasado a escala logarítmica en base 10. Los valores mayores a 1.3 son significativamente relevantes, correspondiente a un cambio relativo igual a 2 en escala logarítmica. Los valores mayores a 1 y menores a -1 tienen un cambio igual a 2. Por lo que las proteínas ubicadas en los cuadrantes marcados son las que tienen un cambio relativo mayor a 2 (en el gráfico menor a -1 o mayor a 1) y un valor de $p < 0.05$ (en el gráfico mayor a 1.3).

También se pudieron realizar gráficos de agrupamiento. Estos permiten ver, mediante un gráfico de calor, como se relacionan las diferentes proteínas con respecto a los diferentes tejidos y/o sexo del nematode, para tal agrupamiento jerárquico primero se realizó una normalización en Z (esto cambia la media de cada fila a 0 y trae la desviación estándar a 1) y se utilizó una distancia euclidiana y el agrupamiento de enlace medio. Otra herramienta presente en Perseus es la posibilidad de realizar gráficos de perfil, mediante los cuales se puede ver la distribución de las intensidades de diferentes proteínas en los diferentes tejidos.

Análisis de ortología.

La primera parte del análisis fue realizada por la Dra. Kamenetzky como se describe a continuación. Se seleccionaron un grupo de treinta genomas, entre los cuales se encuentra el genoma de *Homo sapiens*, el genoma de varios nematodos, entre los cuales se encuentran algunos del clado I al que pertenece *D. renale*, otros como el de *C. elegans* y además se sumaron genomas de otros Phyla como Placozoa, Arthropoda, Platyhelminthes, Cnidaria, Annelida, Porifera, Chordata y Mollusca. Utilizando este conjunto de genomas se procedió a identificar grupos de genes ortólogos mediante el algoritmo MCL como se realizó en Maldonado et al., 2017 (20). Se estableció un valor de inflación en 1,5 y se agrupó un subconjunto de proteínas según los taxones. Para el estudio de proteínas específicas de *D. renale*, primero se filtraron usando Excel, las proteínas para las cuales no existían ortólogos dentro del grupo de estudio seleccionado, luego se buscaron aquellas proteínas para las cuales teníamos asignado un término GO (21) y de este listado se tomaron los términos GO, se ordenaron de forma tal que no estén repetidos, para poder estudiarlos con el programa Revigo (22), con este programa se pueden visualizar diferentes agrupaciones de proteínas de la siguiente forma: a) proceso biológico, b) componente celular o c) función molecular; estas agrupaciones el programa las realiza según el término GO asignado. Se utilizó en particular la opción de componente celular, para buscar el término GO asociado a exosomas o extracelular, teniendo la certeza de que en *D. renale* existían proteínas con ese código asignado, luego las buscamos en el listado de Excel que se encuentra en la tabla anexa 3.

Bibliografía

1. Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal Biochem. 1976 May 7;72(1-2):248-54.

2. LAEMMLI UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug;227(5259):680–5.
3. Uversky VN. Use of fast protein size-exclusion liquid chromatography to study the unfolding of proteins which denature through the molten globule. *Biochemistry*. 1993 Dec 1;32(48):13288–98.
4. Franchini GR, Curto LM, Caramelo JJ, MarÃa Delfino J. Dissection of a β^2 -barrel motif leads to a functional dimer: The case of the intestinal fatty acid binding protein. *Protein Science*. 2009 Dec;18(12):2592–602.
5. Kennedy MW, Brass A, McCruden AB, Price NC, Kelly SM, Cooper A. The ABA-1 Allergen of the Parasitic Nematode *Ascaris suum*: Fatty Acid and Retinoid Binding Function and Structural Characterization. *Biochemistry*. 1995 May 23;34(20):6700–10.
6. Meenan NAG, Ball G, Bromek K, Uhrin D, Cooper A, Kennedy MW, et al. Solution Structure of a Repeated Unit of the ABA-1 Nematode Polyprotein Allergen of *Ascaris* Reveals a Novel Fold and Two Discrete Lipid-Binding Sites. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Apr 19;5(4):e1040.
7. PEDRASSANI D. Aspectos morfológicos, imunológicos e epidemiológicos do *Diectophyme renale* em cães no Distrito de São Cristóvão, Três Barras, Santa Catarina. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias; 2009.
8. XIA Y, SPENCE HJ, MOORE J, HEANEY N, McDERMOTT L, COOPER A, et al. The ABA-1 allergen of *Ascaris lumbricoides* : sequence polymorphism, stage and tissue-specific expression, lipid binding function, and protein biophysical properties. *Parasitology*. 2000 Feb 1;120(2):211–24.
9. FOLCH J, LEES M, SLOANE STANLEY GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957 May;226(1):497–509.
10. Obal G, Ramos AL, Silva V, Lima A, Batthyany C, Bessio MI, et al. Characterisation of the Native Lipid Moiety of *Echinococcus granulosus* Antigen B. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012 May 15;6(5):e1642.
11. Pedrassani D. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS CÂMPUS DE JABOTICABAL ASPECTOS MORFOLÓGICOS, IMUNOLÓGICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DO *Diectophyme renale* EM CÃES NO DISTRITO DE SÃO CRISTÓVÃO, TRÊS BARRAS, SANTA CATARINA. 2009.
12. Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jan 4;44(D1):D67–72.
13. Tokiwa T, Ueda W, Takatsuka S, Okawa K, Onodera M, Ohta N, et al. The first genetically confirmed case of *Diectophyme renale* (Nematoda: Diectophymatida) in a patient with a subcutaneous nodule. *Parasitol Int [Internet]*. 2014 Feb [cited 2023 Mar 8];63(1):143–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24095916/>
14. Nei M, Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York, U.S.A. : New York, U.S.A. : Oxford University Press; 2000.
15. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol*. 2018 Jun 1;35(6):1547–9.

16. Santos J, Giraldez R. The effect of C-heterochromatin in chiasma terminalisation in *Chorthippus biguttulus* L. (Acrididae, Orthoptera). . Chromosome 70. 1978;59–66.
17. Gisela Franchini. “Análisis estructura-función de proteínas que unen ácidos grasos (FABP) de intestino de rata (*Rattus norvegicus*)”. . [La Plata]: UNLP. Argentina; 2006.
18. Rao AU, Carta LK, Lesuisse E, Hamza I. Lack of heme synthesis in a free-living eukaryote. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005 Mar 22;102(12):4270–5.
19. Luck AN, Yuan X, Voronin D, Slatko BE, Hamza I, Foster JM. Heme acquisition in the parasitic filarial nematode *Brugia malayi*. The FASEB Journal. 2016 Oct 30;30(10):3501–14.
20. Maldonado LL, Assis J, Araújo FMG, Salim ACM, Macchiaroli N, Cucher M, et al. The *Echinococcus canadensis* (G7) genome: a key knowledge of parasitic platyhelminth human diseases. BMC Genomics. 2017 Dec 27;18(1):204.
21. Harris MA, Clark J, Ireland A, Lomax J, Ashburner M, Foulger R, et al. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. Nucleic Acids Res. 2004 Jan 1;32(Database issue):D258-61.
22. Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T. REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. PLoS One. 2011 Jul 18;6(7):e21800.

Lista anexa 1

Digestivo- Esófago

Protein IDs	Mapping GO Term
-------------	-----------------

DREN_g2494.	locomotory behavior-IEA;actin filament binding-IEA;actin binding-IEA;actin cytoskeleton organization-IEA;muscle cell cellular hom
-------------	---

DREN_g2496.	actin filament binding-IEA;actin binding-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;actin cytoskeleton organization
-------------	--

DREN_g4607.	cytoskeleton-IEA;cytoplasm-IEA;adherens junction-IEA;actin binding-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;cyt
-------------	--

DREN_g7199.	cortical actin cytoskeleton organization-IEA;mitotic spindle-IEA;membrane-IEA;clathrin-coated pit-IEA;cytoplasmic vesicle-IEA;apic
-------------	--

DREN_jg3249.	mitochondrial matrix-IEA;citrate (Si)-synthase activity-IEA;tricarboxylic acid cycle-IEA;transferase activity-IEA;citrate metabolic pro
--------------	---

DREN_jg1046	peptidase activity-IEA;proteolysis-IEA;integral component of membrane-IEA;serine-type endopeptidase activity-IEA;peptidase acti
-------------	---

DREN_jg1048.	carboxypeptidase activity-IEA;metal ion binding-IEA;proteolysis-IEA;metallopeptidase activity-IEA;hydrolase activity-IEA;carboxy
--------------	--

DREN_jg1123.	myosin complex-IEA;nucleotide binding-IEA;cytoplasm-IEA;actin filament binding-IEA;actin binding-IEA;myosin filament-IEA;myofi
--------------	--

DREN_jg1453.	marginal zone B cell differentiation-IEA;inflammatory response to antigenic stimulus-IEA;glomerular capillary formation-IEA;in ute
--------------	--

DREN_jg1583.	metal ion binding-IEA;peptidase activity-IEA;proteolysis-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;DNA integratio
--------------	---

DREN_jg1619.	extracellular ligand-gated ion channel activity-IEA;membrane-IEA;ion transmembrane transport-IEA;integral component of memb
--------------	---

DREN_jg2946.	carboxylic ester hydrolase activity-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;hydrolase activity-IEA
--------------	--

DREN_jg3419.	cytoplasm-IEA;peptidase activity-IEA;proteolysis-IEA;metalloaminopeptidase activity-IEA;manganese ion binding-IEA;aminopeptid
--------------	---

DREN_jg3744.	peptidase activity-IEA;metal ion binding-IEA;proteolysis-IEA;metallopeptidase activity-IEA;metalloendopeptidase activity-IEA;hydr
--------------	---

DREN_jg5137.	thymidylate synthase (FAD) activity-IEA;viral release from host cell-IEA;DNA biosynthetic process-IEA;DNA recombination-IEA;G pr
--------------	--

DREN_jg5213.	glutathione metabolic process-IEA;glutathione metabolic process-IBA;transferase activity-IEA;glutathione transferase activity-IBA
--------------	---

DREN_jg5450.	proteolysis-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;serine-type peptidase activity-IEA;aminopeptidase activity-I
--------------	--

DREN_jg5912.	barbed-end actin filament capping-IBA;actin filament severing-IBA;cytoplasm-IBA;actin filament binding-IEA;actin filament binding
--------------	---

DREN_jg6127.	glycosyltransferase activity-IEA;UDP-glycosyltransferase activity-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;glucuro
--------------	---

DREN_jg6171.	basement membrane-IEA;cell-matrix adhesion-IEA;cell adhesion-IEA;membrane-IEA;calcium ion binding-IEA;integral component o
--------------	--

DREN_jg6343. metal ion binding-IEA;peptidase activity-IEA;peptidase activity-IBA;proteolysis-IEA;metalloaminopeptidase activity-IEA;manganese

DREN_jg654.t metal ion binding-IEA;peptidase activity-IEA;proteolysis-IEA;metallopeptidase activity-IEA;metalloendopeptidase activity-IEA;hydr

DREN_jg7556. membrane-IEA;calcium ion binding-IEA;integral component of membrane-IEA

DREN_jg7832. lipid binding-IEA DREN_jg8622.t1

DREN_jg9103. zinc ion binding-IEA;metal ion binding-IEA;peptidase activity-IEA;proteolysis-IEA;metallopeptidase activity-IEA;aminopeptidase act

DREN_jg9428. carboxypeptidase activity-IEA;peptidase activity-IEA;metal ion binding-IEA;membrane-IEA;proteolysis-IEA;peptidyl-dipeptidase act

DREN_jg9776. peptidase activity-IEA;regulation of catalytic activity-IEA;proteolysis-IEA;cysteine-type endopeptidase activity-IEA;cysteine-type pe Protein IDs Mapping GO Term

DREN_jg5771. cell adhesion-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;cell adhesion-IEA;membrane-IEA;integral component of m

DREN_g1228. metal ion binding-IEA;dipeptidase activity-IEA;proteolysis-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;intracellular m

DREN_g1261. cellular copper ion homeostasis-IEA;mitochondrion-IEA;metal ion binding-IEA;copper ion binding-IEA;membrane-IEA;integral com

DREN_g1485. cytoplasm-IEA;cytoplasm-IBA;adenine phosphoribosyltransferase activity-IEA;adenine phosphoribosyltransferase activity-IBA;met

DREN_g1544. GTP binding-IEA;nucleotide binding-IEA;mitochondrion-IEA;GTPase activity-IEA;UDP-glucosylation-IEA;UDP-glucose:glycoprotein g

DREN_g175.t1nucleotide binding-IEA;cytoplasm-IEA;membrane-IEA;post-embryonic body morphogenesis-IEA;integral component of membrane

DREN_jg5523. actin binding-IEA;actin binding-IEA

DREN_g1949. cellular response to xenobiotic stimulus-IEA;ubiquitin-dependent protein catabolic process-IEA;cellular response to xenobiotic sti

DREN_g202.t1nucleotide binding-IEA;GTP binding-IEA;cytoplasm-IEA;metal ion binding-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IE

DREN_g2065. erythrocyte differentiation-IEA;negative regulation of transcription by RNA polymerase II-IEA;maturation of SSU-rRNA from tricistr

DREN_g209.t1extracellular space-IEA;serine-type endopeptidase inhibitor activity-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;extr

DREN_g2146. calcium ion binding-IEA;membrane-IEA;calcium ion binding-IEA;integral component of membrane-IEA DREN_g227.t1endopeptidase inhibitor activity-IEA;cysteine-type endopeptidase inhibitor activity-IEA;negative regulation of endopeptidase activ DREN_jg7566. RNA binding-IEA;nucleic acid binding-IEA;RNA binding-IEA;nucleic acid binding-IEA

DREN_g2438. nucleotide binding-IEA;GTP binding-IEA;vesicle-mediated transport-IEA;GTPase activity-IEA;protein transport-IEA;Golgi apparatus-

DREN_g2482. tRNA aminoacylation for protein translation-IEA;nucleotide binding-IEA;aminoacyl-tRNA ligase activity-IEA;metal ion binding-IEA;c

DREN_g2634. structural constituent of ribosome-IEA;ribosome-IEA;translation-IEA;structural constituent of ribosome-IEA;ribosome-IEA;translati

DREN_g2649. nucleotide binding-IEA;cytoplasm-IEA;membrane-IEA;proteolysis-IEA;integral component of membrane-IEA;transferase activity-IE

DREN_g2956. RNA-3'-phosphate cyclase activity-IEA;RNA-3'-phosphate cyclase activity-IBA;nucleotide binding-IEA;catalytic activity-IEA;RNA pro

DREN_jg4933. endoplasmic reticulum membrane-IEA;nucleotide binding-IEA;cytoplasm-IEA;oxidoreductase activity-IEA;catalytic activity-IEA;met

DREN_jg7741. GTP binding-IEA;nucleotide binding-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;GTP binding-IEA;nucleotide binding

DREN_jg1043 misfolded protein binding-IEA;misfolded protein binding-IBA;endoplasmic reticulum membrane-IEA;endoplasmic reticulum unfold

DREN_g3665. nucleotide binding-IEA;unfolded protein binding-IEA;ATP binding-IEA;protein folding-IEA;nucleotide binding-IEA;unfolded protein

DREN_g3910. membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA

DREN_g4000.t1;DREN_jg6577.t1

DREN_g4024. translation initiation factor activity-IEA;nucleotide binding-IEA;RNA helicase activity-IEA;membrane-IEA;integral component of me

DREN_g4046. SCF complex assembly-IEA;cytoplasm-IEA;cytoplasm-ISO;cytoplasm-ISS;positive regulation of transcription, DNA-templated-IDA;u

DREN_jg6970. tRNA aminoacylation for protein translation-IEA;nucleotide binding-IEA;cytoplasm-IEA;aminoacyl-tRNA ligase activity-IEA;membra

DREN_g4391. calcium ion binding-IEA;endoplasmic reticulum-IEA;calcium ion binding-IEA;endoplasmic reticulum-IEA;calcium ion binding-IEA;en

DREN_g4527. GTP binding-IEA;cytoplasm-IEA;GTPase activity-IEA;cytosol-IBA;negative regulation of transcription, DNA-templated-IEA;intracellu

DREN_g460.t1RNA binding-IEA;RNA splicing-IEA;structural constituent of ribosome-IEA;regulation of transcription, DNA-templated-IEA;mRNA pr

DREN_g4603. nucleotide binding-IEA;citrate dehydratase activity-IEA;metal ion binding-IEA;mitochondrion-IEA;Mre11 complex-IEA;4 iron, 4 sulf

DREN_jg5111. tRNA aminoacylation for protein translation-IEA;DNA binding-IEA;nucleotide binding-IEA;DNA-binding transcription factor activity

DREN_jg616.t cytoplasm-IBA;cell surface-IEA;protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase activity-IEA;protein-L-isoaspartate (D-asp

DREN_jg456.t nucleotide binding-IEA;proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1)-IEA;proton-transporting ATPase activity, rot

DREN_g4848. metal ion binding-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;heme binding-IEA;perinuclear region of cytoplasm-IE

DREN_jg2494. protein import into nucleus-IEA;cytoplasm-IEA;protein transport-IEA;nucleus-IEA;protein import into nucleus-IEA;cytoplasm-IEA;p

DREN_g5072. metal ion binding-IEA;structural constituent of eye lens-IEA;metal ion binding-IEA;structural constituent of eye lens-IEA

DREN_jg9286. structural constituent of ribosome-IEA;structural constituent of ribosome-IBA;cytosolic small ribosomal subunit-IBA;ribosome-IEA

DREN_g5516. endoplasmic reticulum membrane-IEA;peptidase activity-IEA;peptidase activity-IBA;membrane-IEA;proteolysis-IEA;integral compo

DREN_g5531. vacuolar proton-transporting V-type ATPase, V0 domain-IEA;proton transmembrane transporter activity-IEA;membrane-IEA;integ

DREN_g6025. 'de novo' GDP-L-fucose biosynthetic process-IEA;GDP-mannose metabolic process-IEA;GDP-mannose 4,6-dehydratase activity-IEA

DREN_jg1537. RNA binding-IEA;nucleic acid binding-IEA;RNA binding-IEA;nucleic acid binding-IEA;RNA binding-IEA;nucleic acid binding-IEA;RNA b

DREN_g6040. proton transmembrane transporter activity-IEA;proton transmembrane transport-IEA;ion transport-IEA;proton-transporting V-typ

DREN_g615.t1protein binding-IPI;Golgi vesicle docking-IBA;vesicle-mediated transport-IEA;cytoplasm-IEA;membrane-IEA;cytosol-IEA;cytosol-IDA

DREN_g6254. RNA binding-IEA;nucleic acid binding-IEA;RNA binding-IEA;nucleic acid binding-IEA

DREN_g6298. structural constituent of ribosome-IEA;protein heterodimerization activity-IEA;transcription initiation from RNA polymerase II pro

DREN_jg4544. cytoplasm-IEA;type II pneumocyte differentiation-IEA;positive regulation of aminoacyl-tRNA ligase activity-IEA;positive regulation

DREN_g6382.t1;DREN_jg4604.t1

DREN_g6405. nucleotide binding-IEA;RNA binding-IEA;membrane-IEA;calcium ion binding-IEA;integral component of membrane-IEA;RNA 3'-end

DREN_g6532. DNA binding-IEA;translation initiation factor activity-IEA;positive regulation of transcription elongation from RNA polymerase II pr

DREN_g6540. membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;methyltransferase activity-IBA;membrane-IEA;integral component of memb

DREN_jg8818. nucleotide binding-IEA;cellular protein modification process-IEA;ubiquitin-like modifier activating enzyme activity-IEA;ligase activi

DREN_g6967. cytoplasm-IEA;glycogen biosynthetic process-IEA;catalytic activity-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;beta-

DREN_jg3703. endoplasmic reticulum membrane-IEA;sarcoplasmic reticulum-IEA;melanosome-IEA;membrane-IEA;calcium ion binding-IEA;calciu

DREN_g7058. metal ion binding-IEA;metal ion binding-IEA

DREN_g7374. tRNA aminoacylation for protein translation-IEA;nucleotide binding-IEA;cytoplasm-IEA;cytoplasm-IBA;mitochondrial glycyl-tRNA a

DREN_jg828.t intramolecular transferase activity-IEA;cobalamin binding-IEA;mitochondrial matrix-IEA;metal ion binding-IEA;catalytic activity-IEA

DREN_g7712. tRNA aminoacylation for protein translation-IEA;nucleotide binding-IEA;aminoacyl-tRNA ligase activity-IEA;tryptophanyl-tRNA ami

DREN_g783.t1osteoclast differentiation-IEA;zinc ion binding-IEA;metal ion binding-IEA;cytosol-IEA;lyase activity-IEA;negative regulation of apopt

DREN_g7900. ribosome biogenesis-IEA;mature ribosome assembly-IEA;ribosome biogenesis-IEA;mature ribosome assembly-IEA

DREN_g7965. nucleotide binding-IEA;phosphorylation-IEA;transferase activity-IEA;protein kinase activity-IEA;kinase activity-IEA;protein serine/t

DREN_jg6332. membrane-IEA;protein prenylation-IEA;integral component of membrane-IEA;transferase activity-IEA;protein prenyltransferase a

DREN_g8088. RNA binding-IEA;structural constituent of ribosome-IEA;ubiquitin-like modifier activating enzyme activity-IEA;large ribosomal subu

DREN_jg9196. exocyst-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;exocytosis-IEA;positive regulation of translational termination-I

DREN_g827.t1vesicle-mediated transport-IEA;clathrin adaptor complex-IEA;membrane-IEA;protein transport-IEA;intracellular protein transport-

DREN_g828.t1proteolysis-IEA;isopeptidase activity-IEA;metallopeptidase activity-IEA;proteasome complex-IEA;Lys63-specific deubiquitinase acti

DREN_g8305. endosome-IEA;GTP binding-IEA;retromer complex-IEA;GTPase activity-IEA;viral release from host cell-IEA;cytosol-IEA;early endoso

DREN_g8316. nucleotide binding-IEA;glucose binding-IEA;cellular glucose homeostasis-IEA;glucose 6-phosphate metabolic process-IEA;membra

DREN_jg9395. RNA binding-IEA;structural constituent of ribosome-IEA;cytosolic large ribosomal subunit-IEA;ribosome-IEA;RNA binding-IEA;struc DREN_g8922.

DNA binding-IEA;SWI/SNF complex-IEA;structural constituent of ribosome-IEA;membrane-IEA;ATP-dependent chromatin remodel

DREN_jg7200. TPR domain binding-IEA;nucleotide binding-IEA;pole plasm mRNA localization-IEA;cytoplasm-IEA;centrosome-IEA;response to hea

DREN_g9346. nucleotide binding-IEA;cell division-IEA;ATP hydrolysis activity-IEA;hydrolase activity-IEA;ATP binding-IEA;nucleotide binding-IEA;c

DREN_jg162.t1;DREN_g9446.t1

DREN_jg5636. phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) activity-IEA;gluconeogenesis-IEA;nucleotide binding-IEA;GTP binding-IEA;metal ion bin

DREN_jg171.t mitochondrion-IEA;membrane-IEA;ATP synthesis coupled electron transport-IEA;mitochondrial inner membrane-IEA;mitochondri

DREN_jg216.t methylmalonyl-CoA epimerase activity-IEA;methylmalonyl-CoA epimerase activity-IBA;methylmalonyl-CoA epimerase activity-ISO;

DREN_g9554. chitin binding-IEA;catalytic activity-IEA;carbohydrate metabolic process-IEA;hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not

DREN_jg1004 protein disulfide isomerase activity-IEA;endoplasmic reticulum-IEA;endoplasmic reticulum lumen-IEA;isomerase activity-IEA

DREN_jg1008 nucleotide binding-IEA;RNA helicase activity-IEA;helicase activity-IEA;ATP binding-IEA;hydrolase activity-IEA;nucleic acid binding-IE

DREN_jg1009 mitochondrion-IEA;membrane-IEA;mitochondrial inner membrane-IEA;mitochondrion-IEA;membrane-IEA;mitochondrial inner me

DREN_jg1021 identical protein binding-IPI;identical protein binding-IEA;regulation of autophagy-IEA;metal ion binding-IEA;mitochondrion-N/A;m

DREN_jg1030 superoxide metabolic process-IEA;antioxidant activity-IEA;oxidoreductase activity-IEA;metal ion binding-IEA;removal of superoxid

DREN_jg1030 superoxide metabolic process-IEA;antioxidant activity-IEA;metal ion binding-IEA;oxidoreductase activity-IEA;copper ion binding-IB

DREN_jg1033 ribosome biogenesis-IEA;ribosome-IEA;ribosome biogenesis-IEA;ribosome-IEA

DREN_jg1036 nucleotide binding-IEA;GMP metabolic process-IEA;purine nucleotide metabolic process-IEA;guanylate kinase activity-IEA;phosph

DREN_jg1039 SCAR complex-IBA;regulation of actin filament polymerization-IEA;cytoplasm-IEA;regulation of translation-IBA;RNA 7-methylguan

DREN_jg1042 peptidase activity-IEA;mitochondrion-IEA;membrane-IEA;proteolysis-IEA;integral component of membrane-IEA;calcium ion bindin

DREN_jg1058 gluconeogenesis-IEA;gluconeogenesis-IBA;metabolic process-IEA;nucleotide binding-IEA;cytoplasm-IEA;cytoplasm-IBA;pyruvate ca

DREN_jg1097.t1

DREN_jg1146. endoplasmic reticulum membrane-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;intracellular sterol transport-IEA;end

DREN_jg1154. oxidoreductase activity-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA

DREN_jg1223. nucleotide binding-IEA;citrate dehydratase activity-IEA;mitochondrion-IEA;metal ion binding-IEA;Mre11 complex-IEA;4 iron, 4 sulf

DREN_jg1227. oxidoreductase activity-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA

DREN_jg1228. oxidoreductase activity-IEA

DREN_jg1272. oxygen binding-IEA;oxygen transport-IEA;heme binding-IEA;oxygen carrier activity-IEA

DREN_jg1299.t1

DREN_jg1333. mitochondrion-IEA;protein import into mitochondrial matrix-IEA;membrane-IEA;chaperone binding-IEA;integral component of me

DREN_jg1351. glycosyltransferase activity-IEA;RNA binding-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;transferase activity-IEA;pro

DREN_jg1382. heat shock protein binding-IEA;response to heat-IEA;metal ion binding-IEA;membrane-IEA;cytosol-IBA;Hsp70 protein binding-IEA;

DREN_jg1399. carbohydrate binding-IEA

DREN_jg1462. cytoskeleton-IEA;nucleotide binding-IEA;GTP binding-IEA;GTP binding-IBA;cytoplasm-IEA;cytoplasm-IBA;GTPase activity-IEA;cytos

DREN_jg1509. cytoskeleton-IEA;cytoplasm-IEA;cytoplasm-IBA;cell division-IEA;midbody-IEA;spindle-IEA;cell cycle-IEA;determination of heart left

DREN_jg1575. histone binding-IBA;nucleosome assembly-IEA;chromatin binding-IBA;nucleus-IEA;nucleus-IBA;chromatin-IBA

DREN_jg1598. cytoplasm-IEA;proteasome core complex-IEA;proteasome core complex, alpha-subunit complex-IEA;proteasome complex-IEA;pro

DREN_jg1603. gluconeogenesis-IEA;gluconeogenesis-IBA;catalytic activity-IEA;cell redox homeostasis-IEA;glycolytic process-IEA;glycolytic proces

DREN_jg1651. nucleotide binding-IEA;GTP binding-IEA;GTPase activity-IEA

DREN_jg1685. mitochondrion-IEA;membrane-IEA;protein transport-IEA;mitochondrial outer membrane-IEA;SAM complex-IEA;cytoplasm-IBA;mit

DREN_jg1714. serine-type endopeptidase inhibitor activity-IEA;extracellular space-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;reg

DREN_jg1813. UDP-N-acetylglucosamine 4-epimerase activity-IEA;UDP-glucose 4-epimerase activity-IEA;UDP-glucose 4-epimerase activity-IBA;cy

DREN_jg188.t negative regulation of cell growth-IEA;cellular response to glucose stimulus-IEA;positive regulation of apoptotic process-IEA;rescu

DREN_jg208.t nucleotide binding-IEA;oxidoreductase activity-IEA;NAD binding-IEA;NADP binding-IEA;glycolytic process-IEA;glyceraldehyde-3-ph

DREN_jg2108. nucleotide binding-IEA;membrane-IEA;glycolytic process-IEA;phosphoglycerate kinase activity-IEA;integral component of membra

DREN_jg2150. DNA binding-IEA;nucleotide binding-IEA;actin binding-IEA;somitogenesis-IEA;catalytic activity-IEA;mesodermal cell migration-IEA;c

DREN_jg2172. response to oxidative stress-IEA;glutathione peroxidase activity-IEA;peroxidase activity-IEA;oxidoreductase activity-IEA;cellular oxi

DREN_jg2198. oxidoreductase activity-IEA;proton-transporting two-sector ATPase complex, proton-transporting domain-IEA;proton transmembr

DREN_jg227.t structural constituent of ribosome-IEA;ribosome-IEA;translation-IEA

DREN_jg2303. cytoskeleton-IEA;nucleotide binding-IEA;GTP binding-IEA;cytoplasm-IEA;GTPase activity-IEA;cytoskeleton organization-IEA;structu

DREN_jg2331. nucleotide binding-IEA;endoplasmic reticulum membrane-IEA;vesicle-mediated transport-IEA;extracellular space-IBA;dopaminerg

DREN_jg2335. cytoskeleton-IEA;GTP binding-IEA;GTP binding-IBA;nucleotide binding-IEA;cytoplasm-IEA;cytoplasm-IBA;GTPase activity-IEA;cytos

DREN_jg2362.t1

DREN_jg2462. metabolic process-IEA;alpha-mannosidase activity-IEA;alpha-mannosidase activity-IBA;metal ion binding-IEA;catalytic activity-IEA;

DREN_jg2483. membrane raft-IEA;cytosol-IBA;membrane-IEA;protein deglycation, glyoxal removal-IBA;single fertilization-IEA;protein deglycase

DREN_jg2493. cellular amino acid metabolic process-IEA;asparaginase activity-IEA;cellular amino acid metabolic process-IEA;asparaginase activit

DREN_jg2530. RNA binding-IEA;structural constituent of ribosome-IEA;structural constituent of ribosome-IBA;cytosolic large ribosomal subunit-I

DREN_jg2758.t1;DREN_g2243.t1

DREN_jg2893. zinc ion binding-IEA;metal ion binding-IEA;GDP-mannose biosynthetic process-IEA;mannose-6-phosphate isomerase activity-IEA;c

DREN_jg2909. ubiquitin binding-IEA;protein transport-IEA;phosphatidylinositol binding-IEA

DREN_jg2931. metal ion binding-IEA;catalytic activity-IEA;lyase activity-IEA

DREN_jg2973. L-lactate dehydrogenase activity-IEA;cytoplasm-IEA;oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP a DREN_jg2995.t1

DREN_jg3047. nucleotide binding-IEA;carboxypeptidase activity-IEA;metal ion binding-IEA;peptidase activity-IEA;oxidoreductase activity-IEA;prot DREN_jg3050. cytoplasm-IEA;tRNA dihydrouridine synthesis-IEA;tRNA dihydrouridine synthase activity-IEA;catalytic activity-IEA;flavin adenine di

DREN_jg3162. mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex, coupling factor F(o)-IEA;nucleotide binding-IEA;mitochondrion-IEA;me DREN_jg3171. cytoplasm-IEA;protein kinase binding-IEA

DREN_jg3212. RNA binding-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;nucleic acid binding-IEA;RNA binding-IEA;membrane-IEA;in

DREN_jg3217. pentose-phosphate shunt-IEA;oxidoreductase activity-IEA;phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating) activity-IEA;NADP

DREN_jg3312. glucose binding-IEA;nucleotide binding-IEA;cellular glucose homeostasis-IEA;glucose 6-phosphate metabolic process-IEA;phospho

DREN_jg3368. cytoplasm-IEA;growth factor activity-IEA;signal transduction-IEA;membrane-IEA;lipid metabolic process-IEA;Nem1-Spo7 phosphat

DREN_jg339.t ATP metabolic process-IEA;proton transmembrane transport-IEA;proton-transporting V-type ATPase, V1 domain-IEA;ion transport

DREN_jg3418. cysteine-type endopeptidase inhibitor activity-IEA;negative regulation of endopeptidase activity-IEA;cysteine-type endopeptidase

DREN_jg3446. cytoplasm-IEA;'de novo' pyrimidine nucleobase biosynthetic process-IEA;ATP metabolic process-IEA;phosphorylation-IEA;transfer

DREN_jg3471. membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;carbohydrate binding-IEA

DREN_jg3495.t1

DREN_jg3578. serine-type endopeptidase inhibitor activity-IEA;extracellular space-IEA;extracellular space-IBA;membrane-IEA;integral componen DREN_jg360.t proteasome complex-IEA

DREN_jg3651. nucleotide binding-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;ATP binding-IEA;nucleotide binding-IEA;membrane-I

DREN_jg3718. endoplasmic reticulum membrane-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;endoplasmic reticulum-IEA

DREN_jg3730. protein homodimerization activity-IEA;mitochondrial matrix-IEA;mitochondrion-IEA;chaperone binding-IEA;regulation of catalytic

DREN_jg3797.t1

DREN_jg389.t metal ion binding-IEA;calcium ion binding-IEA;endoplasmic reticulum-IEA;unfolded protein binding-IEA;endoplasmic reticulum lum

DREN_jg402.t translation elongation factor activity-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;translational elongation-IEA;transl

DREN_jg4034. mitochondrial respiratory chain complex I-IBA;metal ion binding-IEA;oxidoreductase activity-IEA;mitochondrial electron transport,

DREN_jg4103. membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA

DREN_jg4213. cytoplasm-IBA;protein ufmylation-IEA;protein K69-linked ufmylation-IBA;nucleus-IBA

DREN_jg4226. cytoplasm-IEA;proteolysis-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;serine-type peptidase activity-IEA;hydrolase

DREN_jg4251. phosphopyruvate hydratase activity-IEA;magnesium ion binding-IEA;glycolytic process-IEA;lyase activity-IEA;phosphopyruvate hyd

DREN_jg4258. GTP binding-IEA;lipid droplet-IEA;GTPase activity-IEA;membrane-IEA;apical plasma membrane-IEA;plasma membrane-IEA;eye dev

DREN_jg4268. pyridoxal phosphate binding-IEA;deadenylation-dependent decapping of nuclear-transcribed mRNA-IEA

DREN_jg4285. chemotaxis-IEA;mating behavior-IEA;GTP binding-IEA;nucleotide binding-IEA;regulation of pharyngeal pumping-IEA;GTPase activit

DREN_jg4379. DNA binding-IEA;condensed chromosome-IEA;protein heterodimerization activity-IEA;negative regulation of transcription,

DNA-te DREN_jg4396. cytoplasm-IEA;proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process-IEA;proteasome core complex-IEA;proteasom

DREN_jg4399. positive regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process-IBA;mitochondrial intermembrane space

DREN_jg4410. cytoskeleton-IEA;protein folding chaperone-IEA;nucleotide binding-IEA;cytoplasm-IEA;centrosome-IEA;cell body-IEA;microtubule

DREN_jg4464. glycosyltransferase activity-IEA;oxidoreductase activity-IEA;tRNA processing-IEA;queueine tRNA-ribosyltransferase activity-IEA;tRN

DREN_jg4689. nucleotide binding-IEA;GTP binding-IEA;GTPase activity-IEA

DREN_jg475.t innate immune response-IEA;autophagy-IEA;ubiquitin binding-IEA;immune system process-IEA

DREN_jg4804. endoplasmic reticulum membrane-IEA;nuclear envelope-IEA;signal transduction-IBA;membrane-IEA;integral component of memb DREN_jg4818. metabolic process-IEA;protein homodimerization activity-IEA;cellular response to interleukin-7-IEA;catalytic activity-IEA;purine nu DREN_jg4821.t1;DREN_g2083.t1

DREN_jg4913.t1

DREN_jg4958. mitochondrion-IEA;membrane-IEA;respirasome-IEA;mitochondrial respiratory chain complex I assembly-IEA;mitochondrial inner

DREN_jg4989. oxidoreductase activity-IEA

DREN_jg506.t membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;ceramide biosynthetic process-IEA;sphingosine N-acyltransferase activity-IE

DREN_jg5068. mRNA cleavage and polyadenylation specificity factor complex-IEA;RNA binding-IEA;oxidoreductase activity-IEA;FMN binding-IEA;

DREN_jg5099. protein disulfide isomerase activity-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;endoplasmic reticulum-IEA;isomera

DREN_jg51.t1 peptidase activity-IEA;proteolysis-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;cysteine-type peptidase activity-IEA;h

DREN_jg5123. oxidoreductase activity-IEA;oxidoreductase activity-IEA

DREN_jg5243. mitochondrion-IEA;membrane-IEA;mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c-IEA;mitochondrial respiratory cha

DREN_jg5283. structural constituent of ribosome-IEA;determination of adult lifespan-IEA;ribosome-IEA;translation-IEA

DREN_jg5393. acyltransferase activity-IEA;mitochondrial matrix-IEA;mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex-IBA;acetyl-CoA biosynthetic

DREN_jg5398. cytoplasm-IEA;Golgi apparatus-IEA;cytoplasm-IEA;Golgi apparatus-IEA

DREN_jg54.t1 transcription coactivator activity-IEA;mRNA export from nucleus-IEA;positive regulation of transcription, DNA-templated-IEA;mito DREN_jg5434.t1

DREN_jg5442. nucleotide binding-IEA;cytoplasm-IEA;metal ion binding-IEA;catalytic activity-IEA;phosphoglycerate mutase activity-IEA;lipid meta

DREN_jg5446. DNA binding-IEA;protein heterodimerization activity-IEA;chromosome-IEA;nucleosome-IEA;nucleus-IEA

DREN_jg5567. calcium ion binding-IEA

DREN_jg5572. microtubule binding-IEA;microtubule-IEA;microtubule cytoskeleton organization-IEA;microtubule binding-IEA;microtubule-IEA;mi

DREN_jg5578. ligase activity-IEA

DREN_jg5647. endoplasmic reticulum membrane-IEA;endoplasmic reticulum membrane-IBA;endoplasmic reticulum membrane-IDA;endoplasmic

DREN_jg5683. low-density lipoprotein particle receptor binding-IEA;negative regulation of signaling receptor activity-IEA;receptor antagonist acti

DREN_jg5738. cytoplasm-IEA;proteasome core complex-IEA;proteasome core complex-IBA;proteasome core complex, alpha-subunit complex-IE

DREN_jg5765. structural constituent of ribosome-IEA;ribosome-IEA;translation-IEA

DREN_jg5775. GTP binding-IEA;GTPase activity-IEA;GTP binding-IEA;GTPase activity-IEA

DREN_jg5853. mannose binding-IEA;mannose binding-IBA;endoplasmic reticulum membrane-IBA;Golgi organization-IBA;cytoplasm-IEA;membra

DREN_jg5876. spicule insertion-IEA;regulation of actin filament polymerization-IEA;regulation of protein binding-IEA;cytoplasm-IEA;negative reg

DREN_jg59.t1 nucleotide binding-IEA;transferase activity-IEA;ATP binding-IEA

DREN_jg597.t oxidoreductase activity-IEA;collagen binding-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;fibronectin binding-IEA;ext

DREN_jg598.t pseudouridine synthesis-IEA;RNA binding-IEA;metal ion binding-IEA;catalytic activity-IEA;oxidoreductase activity-IEA;pyruvate deh

DREN_jg599.t metal ion binding-IEA;peptidase activity-IEA;proteolysis-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;metallopeptida

DREN_jg6036. RNA binding-IEA;structural constituent of ribosome-IEA;structural constituent of ribosome-IBA;ribonucleoprotein complex binding

DREN_jg6038. nucleocytoplasmic transport-IEA;nucleotide binding-IEA;GTP binding-IEA;GTPase activity-IEA;oogenesis-IEA;embryo development

DREN_jg6096. structural constituent of ribosome-IEA;structural constituent of ribosome-IBA;cytoplasmic translation-IBA;cytosolic large ribosoma

DREN_jg6130. phosphoserine phosphatase activity-IEA;metal ion binding-IEA;L-serine biosynthetic process-IEA;cellular amino acid biosynthetic p

DREN_jg614.t actin binding-IEA;membrane-IEA;actin filament depolymerization-IEA;integral component of membrane-IEA;actin cytoskeleton-IE

DREN_jg6211. protein disulfide isomerase activity-IEA;metal ion binding-IEA;endoplasmic reticulum-IEA;isomerase activity-IEA;endoplasmic retic

DREN_jg6364. membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;hydrolase activity-IEA

DREN_jg6490. aldehyde dehydrogenase (NAD⁺) activity-IEA;aldehyde dehydrogenase (NAD⁺) activity-IBA;3-deoxyglucosone dehydrogenase activ

DREN_jg65.t1 cell surface-IEA;extracellular region-IEA;cell surface-IEA;extracellular region-IEA

DREN_jg6547. hydroxyacylglutathione hydrolase activity-IEA;metal ion binding-IEA;methylglyoxal catabolic process to D-lactate via S-lactoyl-glut

DREN_jg6590. oligosaccharyltransferase complex-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;protein glycosylation-IEA;transferase

DREN_jg6608. protein folding chaperone-IEA;nucleotide binding-IEA;cytoplasm-IEA;cell body-IEA;positive regulation of telomere maintenance vi

DREN_jg6631. cysteine-type endopeptidase inhibitor activity-IEA;negative regulation of endopeptidase activity-IEA

DREN_jg6685. mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex, coupling factor F(o)-IEA;mitochondrion-IEA;proton transmembrane tra

DREN_jg6690. nucleosome assembly-IEA;nucleus-IEA

DREN_jg670.t magnesium ion binding-IEA;magnesium ion binding-IBA;cytoplasm-IEA;inorganic diphosphatase activity-IEA;inorganic diphosphata

DREN_jg6769.t1

DREN_jg6819. cytoplasm-IEA;proteasome core complex-IEA;proteasome core complex, alpha-subunit complex-IEA;proteasome complex-IEA;pro

DREN_jg6838. glutathione metabolic process-IEA;translation elongation factor activity-IEA;translational elongation-IEA;translation-IEA

DREN_jg6900. cytoskeleton-IEA;GTP binding-IEA;GTP binding-IBA;nucleotide binding-IEA;cytoplasm-IEA;cytoplasm-IBA;regulation of GTPase activ

DREN_jg6954. cell adhesion-IEA;axon guidance-IEA;plasma membrane-IEA

DREN_jg7020. endopeptidase inhibitor activity-IEA;extracellular space-IEA;serine-type endopeptidase inhibitor activity-IEA;membrane-IEA;integr

DREN_jg7027. proton-transporting two-sector ATPase complex, catalytic domain-IEA;proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism-

DREN_jg7082. peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity-IEA;peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity-IBA;cytoplasm-IBA;intracellular membra

DREN_jg7088. phosphatase activity-IEA;dephosphorylation-IEA;inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate 5-phosphatase activity-IEA;phosphatidylinosito DREN_jg7097. superoxide metabolic process-IEA;mitochondrial matrix-IEA;protein homotetramerization-IEA;oxidoreductase activity-IEA;metal io DREN_jg7132.t1

DREN_jg7168. membrane-IEA;integral component of membrane-IEA

DREN_jg7230. extracellular space-IBA;peptidase activity-IEA;proteolysis-IEA;regulation of catalytic activity-IEA;cysteine-type endopeptidase activ

DREN_jg7232. oxygen binding-IEA;oxygen transport-IEA;heme binding-IEA;oxygen carrier activity-IEA

DREN_jg727.t carbohydrate derivative binding-IEA;carbohydrate derivative metabolic process-IEA;transaminase activity-IEA;glutamine-fructose-

DREN_jg7306. protein binding-IPI;thiol-dependent deubiquitinase-IEA;thiol-dependent deubiquitinase-TAS;thiol-dependent deubiquitinase-EXP;t

DREN_jg7315. cytoplasm-IEA;calcium ion binding-IEA;regulation of transcription, DNA-templated-IEA;cell cycle-IEA;cytoplasm-IEA;cell division-IE

DREN_jg7316. cytoskeleton-IEA;GTP binding-IEA;GTP binding-IBA;nucleotide binding-IEA;cytoplasm-IEA;cytoplasm-IBA;GTPase activity-IEA;cytos

DREN_jg7518. RNA binding-IEA;nucleic acid binding-IEA

DREN_jg7606.t1;DREN_g2431.t1

DREN_jg772.t nucleotide binding-IEA;GTP binding-IEA;cytoplasm-IEA;translation elongation factor activity-IEA;GTPase activity-IEA;translational e

DREN_jg7769. cytoplasm-IEA;RNA binding-IEA;nucleic acid binding-IEA;cytoplasm-IEA;RNA binding-IEA;nucleic acid binding-IEA

DREN_jg7998. structural constituent of ribosome-IEA;ribosome-IEA;translation-IEA;structural constituent of ribosome-IEA;ribosome-IEA;translati

DREN_jg8021. membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;oxidoreductase activity-IEA;membrane-IEA

DREN_jg8027. oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, disulfide as acceptor-IEA;oxidoreductase activity-IEA;mem

DREN_jg8137. membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;deoxyribonuclease II activity-IEA;hydrolase activity-IEA;DNA metabolic proc

DREN_jg8140. membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;deoxyribonuclease II activity-IEA;hydrolase activity-IEA;DNA metabolic proc

DREN_jg85.t2 serine-type endopeptidase inhibitor activity-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;negative regulation of endo

DREN_jg8540. metabolic process-IEA;fucose metabolic process-IEA;fucose metabolic process-IBA;alpha-L-fucosidase activity-IEA;alpha-L-fucosida

DREN_jg8700. extracellular space-IEA;peptidase activity-IEA;proteolysis-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;serine-type pe

DREN_jg8705. extracellular space-IEA;peptidase activity-IEA;proteolysis-IEA;integral component of membrane-IEA;serine-type peptidase activity-

DREN_jg8728. vesicle-mediated transport-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;perinuclear region of cytoplasm-IEA;endopl

DREN_jg8805. extracellular space-IBA;extracellular region-IEA

DREN_jg8892. metal ion binding-IEA

DREN_jg8910. proteasome regulatory particle-IEA;proteolysis-IEA;proteasome complex-IEA

DREN_jg8914. translation elongation factor activity-IEA;VCB complex-IEA;VCB complex-IBA;translational elongation-IEA;transcription elongation

DREN_jg8954. nucleotide binding-IEA;proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1)-IEA;membrane-IEA;ATP metabolic process-I DREN_jg8968. proteasome complex-IEA;proteasome assembly-IEA

DREN_jg8978. membrane-IEA;integral component of membrane-IEA

DREN_jg9003. nucleic acid binding-IEA

DREN_jg9012. transmembrane transport-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;symporter activity-IEA;transmembrane trans

DREN_jg9124. endoplasmic reticulum membrane-IEA;cell division-IEA;membrane-IEA;proteolysis-IEA;integral component of membrane-IEA;nucl

DREN_jg9191. 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase activity-IEA;acyltransferase activity-IEA;acyltransferase activity, transferring groups other

DREN_jg9208. acetate metabolic process-IEA;acetyl-CoA hydrolase activity-IEA;acetate CoA-transferase activity-IEA;transferase activity-IEA;propi

DREN_jg9209. acetate metabolic process-IEA;acetyl-CoA hydrolase activity-IEA;acetate CoA-transferase activity-IEA;transferase activity-IEA;propi

DREN_jg9223. peptidase activity-IEA;proteolysis-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;cysteine-type peptidase activity-IEA;h

DREN_jg9224. zinc ion binding-IEA;metal ion binding-IEA;peptidase activity-IEA;proteolysis-IEA;membrane-IEA;metallopeptidase activity-IEA;met

DREN_jg9231.t1

DREN_jg9322. translation elongation factor activity-IEA;translational elongation-IEA;translation-IEA;eukaryotic translation elongation factor 1 co

DREN_jg9479. catalytic activity-IEA

DREN_jg9492. GDP-Man:Man2GlcNAc2-PP-dolichol alpha-1,6-mannosyltransferase activity-IEA;glycosyltransferase activity-IEA;oxidoreductase a

DREN_jg9496. RNA binding-IEA;regulation of RNA splicing-IEA;nucleic acid binding-IEA;RNA binding-IEA;regulation of RNA splicing-IEA;nucleic aci

DREN_jg961.t1

DREN_jg9686. mitochondrial fission-IEA;nucleotide binding-IEA;ATPase-coupled transmembrane transporter activity-IEA;transmembrane transp

DREN_jg9710. cytoskeleton-IEA;nucleotide binding-IEA;cytoplasm-IEA;oxidoreductase activity-IEA;dynein complex-IEA;microtubule-IEA;ATP bind

DREN_jg9797. structural constituent of ribosome-IEA;ribosome-IEA;translation-IEA

DREN_jg9856. protein binding-IPI;ubiquitin protein ligase binding-IBA;metal ion binding-IEA;ubiquitin binding-IBA;ubiquitin-dependent protein c

DREN_jg9861. Set1C/COMPASS complex-IEA;Set1C/COMPASS complex-IBA;chromosome, telomeric region-IEA;MLL3/4 complex-IEA;chromatin s

DREN_jg9912. catalytic activity-IEA;tricarboxylic acid cycle-IEA;lyase activity-IEA;fumarate metabolic process-IEA;fumarate hydratase activity-IEA

DREN_jg9932. calcium ion binding-IEA;calcium-dependent phospholipid binding-IEA;cytoplasm-IBA;negative regulation of coagulation-IEA;calciu

DREN_jg995.t metabolic process-IEA;nucleotide binding-IEA;5-amino-4-imidazole carboxylate lyase activity-IEA;purine nucleotide biosynthetic p

DREN_jg999.t membrane-IEA;integral component of membrane-IEA

Gónada de macho-gónada de hembra

Majority protein IDs	Mapping GO Term
----------------------	-----------------

DREN_g1003.t1;DREN_jg5696.t1 nuclear envelope-IEA;endoplasmic reticulum membrane-IEA;nuclear inner membrane-IEA;membrane-IEA;integral component

DREN_jg486.t1;DREN_g1303.t1 protein binding-IPI;endoplasmic reticulum membrane-IEA;membrane-IEA;lipid metabolic process-IEA;integral component of m DREN_g1337.t1;DREN_jg523.t1

DREN_g1438.t1;DREN_jg8142.t1 vesicle-mediated transport-IEA;cytoplasm-IEA;membrane-IEA;protein transport-IEA;cytoplasmic vesicle-IEA;structural molecule

DREN_g1752.t1;DREN_jg100.t1 endosome-IEA;ubiquitin binding-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;phosphatidylinositol binding-IEA;e

DREN_g202.t1;DREN_jg1741.t1 nucleotide binding-IEA;GTP binding-IEA;cytoplasm-IEA;metal ion binding-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane

DREN_g2029.t1;DREN_jg4759.t1 magnesium ion binding-IEA;intramolecular transferase activity, phosphotransferases-IEA;metal ion binding-IEA;organic substance

DREN_g2296.t1;DREN_jg1435.t1 ubiquitin protein ligase activity-IEA;metal ion binding-IEA;protein polyubiquitination-IEA;protein monoubiquitination-IEA;ligase

DREN_g3082.t1 serine-type endopeptidase inhibitor activity-IEA;extracellular space-IEA;blood coagulation-IEA;extracellular region-IEA;negative

DREN_g3536.t1;DREN_jg10414.t1 peptide catabolic process-IEA;mitotic spindle pole-IEA;condensed chromosome-IEA;cytoplasm-IEA;maintenance of centrosome

DREN_jg2849.t1;DREN_g3626.t1 prenylcysteine catabolic process-IEA;RNA binding-IEA;structural constituent of ribosome-IEA;structural constituent of ribosome

DREN_g395.t1;DREN_jg9798.t1 oxidoreductase activity-IEA;protein dimerization activity-IEA;FMN binding-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane

DREN_jg6774.t1;DREN_g4168.t1 mitochondrion-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;mitochondrial inner membrane-IEA;mitochondrion-I

DREN_g4391.t1;DREN_jg6192.t1;DRcalcium ion binding-IEA;endoplasmic reticulum-IEA;calcium ion binding-IEA;endoplasmic reticulum-IEA;calcium ion binding-IEA

DREN_g4603.t1;DREN_jg7083.t1 nucleotide binding-IEA;citrate dehydratase activity-IEA;metal ion binding-IEA;mitochondrion-IEA;Mre11 complex-IEA;4 iron, 4

DREN_g4673.t1;DREN_jg613.t1 cell motility-IEA;actin filament severing-IEA;actin filament severing-IEA;actin filament severing-IEA;cytoplasm-IEA;cytoplasm-I

DREN_g4679.t1;DREN_jg618.t1 endosome-IEA;GTP binding-IEA;membrane-IEA;calcium ion binding-IEA;endocytic recycling-IEA;endosome membrane-IEA;ATP

DREN_g4824.t1;DREN_jg2470.t1;DRtranscription coregulator activity-IEA;mediator complex-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;nucleus-IEA

DREN_g5072.t1;DREN_jg8243.t1 metal ion binding-IEA;structural constituent of eye lens-IEA;metal ion binding-IEA;structural constituent of eye lens-IEA

DREN_jg10228.t1;DREN_g64.t1 peptide metabolic process-IEA;centriole-IEA;cell division-IEA;metal ion binding-IEA;proteolysis-IEA;membrane-IEA;integral component

DREN_g6540.t1;DREN_jg1910.t1 membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;methyltransferase activity-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane

DREN_g6770.t1;DREN_jg8781.t1 nucleotide binding-IEA;GTP binding-IEA;small GTPase mediated signal transduction-IEA;GTPase activity-IEA;membrane-IEA;G p

DREN_jg3703.t1;DREN_g6970.t1 endoplasmic reticulum membrane-IEA;sarcoplasmic reticulum-IEA;melanosome-IEA;membrane-IEA;calcium ion binding-IEA;calcium

DREN_jg3790.t1;DREN_g7040.t1 protein binding-IEA;nucleotide binding-IEA;cytoplasm-IEA;proteasome regulatory particle, base subcomplex-IEA;protein catabolism

DREN_jg8031.t1;DREN_g742.t1 nucleotide binding-IEA;vesicle-mediated transport-IEA;cytoplasm-IEA;phosphoribosylamine-glycine ligase activity-IEA;metal io

DREN_g7468.t1 cytoplasmic stress granule-IBA;RNA binding-IEA;RNA binding-IBA;cytoplasm-IEA;poly(U) RNA binding-IBA;poly(A) binding-IBA;c

DREN_g7590.t1;DREN_jg1129.t1

DREN_g7816.t1;DREN_jg8305.t1 proteasome regulatory particle-IEA;proteolysis-IEA;isopeptidase activity-IEA;metallopeptidase activity-IEA;proteasome compl

DREN_g828.t1;DREN_jg4054.t1 proteolysis-IEA;isopeptidase activity-IEA;metallopeptidase activity-IEA;proteasome complex-IEA;Lys63-specific deubiquitinase

DREN_g8316.t1;DREN_jg7866.t1 nucleotide binding-IEA;glucose binding-IEA;cellular glucose homeostasis-IEA;glucose 6-phosphate metabolic process-IEA;mem

DREN_jg4317.t2;DREN_jg4317.t1;DREN_g8458.t1

DREN_g8502.t1;DREN_jg4361.t2;DRGPI anchor biosynthetic process-IEA;membrane-IEA;phosphatidylinositol N-acetylglucosaminyltransferase activity-IEA;integral

DREN_jg7353.t1;DREN_g8549.t1 mitochondrial intermembrane space-IEA;mitochondrion-IEA;membrane-IEA;respirasome-IEA;mitochondrial inner membrane-

DREN_g8630.t1;DREN_jg7444.t1 mitochondrion-IEA;carbohydrate metabolic process-IEA;mitochondrion-IEA;carbohydrate metabolic process-IEA

DREN_g8924.t1;DREN_jg7689.t1 serine-type endopeptidase inhibitor activity-IEA;serine-type endopeptidase inhibitor activity-IBA;extracellular space-IBA;negat

DREN_g9396.t1;DREN_jg9277.t1 mitochondrion-IEA;oxidoreductase activity-IEA;metal ion binding-IEA;4 iron, 4 sulfur cluster binding-IEA;2 iron, 2 sulfur cluster

DREN_jg5636.t1;DREN_g945.t1 phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) activity-IEA;gluconeogenesis-IEA;nucleotide binding-IEA;GTP binding-IEA;metal ion

DREN_jg10086.t2;DREN_jg10086.t1 nucleotide binding-IEA;RNA helicase activity-IEA;helicase activity-IEA;ATP binding-IEA;hydrolase activity-IEA;nucleic acid bindin

DREN_jg10196.t2;DREN_jg10196.t1 DNA binding-IEA;purine-rich negative regulatory element binding-IEA;RNA polymerase II transcription regulatory region seque

DREN_jg10365.t1;DREN_g3492.t1 lipid transport-IEA;lipid transporter activity-IEA;lipid transporter activity-IBA;extracellular region-IEA;nutrient reservoir activity

DREN_jg10648.t1 nucleotide binding-IEA;RNA helicase activity-IEA;helicase activity-IEA;hydrolase activity-IEA;ATP binding-IEA;nucleic acid bindin

DREN_jg1361.t1 maturation of LSU-rRNA from tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA)-IEA;maturation of LSU-rRNA from

DREN_jg1581.t1

DREN_jg1634.t1 DNA binding-IEA;DNA duplex unwinding-IEA;nucleotide binding-IEA;DNA helicase activity-IEA;mitochondrial respiratory chain DREN_jg1766.t1 GTP binding-IEA;GTPase activity-IEA

DREN_jg1864.t1 membrane-IEA;integral component of membrane-IEA

DREN_jg2305.t1 cytoskeleton-IEA;GTP binding-IEA;GTP binding-IBA;nucleotide binding-IEA;cytoplasm-IEA;cytoplasm-IBA;GTPase activity-IEA;cy

DREN_jg234.t1;DREN_jg234.t2;DRE vesicle-mediated transport-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;vesicle-mediated transport-IEA;membr DREN_jg287.t1

DREN_jg2929.t1 cytoplasm-IEA;peptidase activity-IEA;proteolysis-IEA;proteasome core complex-IEA;proteasome complex-IEA;threonine-type e DREN_jg3432.t1

DREN_jg3433.t1

DREN_jg3446.t1 cytoplasm-IEA;'de novo' pyrimidine nucleobase biosynthetic process-IEA;ATP metabolic process-IEA;phosphorylation-IEA;tran DREN_jg3556.t1 metabolic process-IEA;angiogenesis-IEA;hexosaminidase activity-IEA;N-acetyl-beta-D-galactosaminidase activity-IEA;beta-N-ac DREN_jg3763.t1 melanin biosynthetic process-IEA;oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecu DREN_jg3797.t1

DREN_jg4264.t1 translation initiation factor activity-IEA;cytoplasm-IEA;formation of cytoplasmic translation initiation complex-IEA;eukaryotic 4 DREN_jg4426.t1;

DREN_g6208.t1 cytoplasm-IEA;proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process-IEA;proteasome core complex-IEA;protea

DREN_jg4470.t1 nucleotide binding-IEA;oxidoreductase activity, acting on the CH-NH2 group of donors, NAD or NADP as acceptor-IEA;oxidored

DREN_jg4525.t1

DREN_jg4526.t1 membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;cell surface-IEA;extracellular region-IEA

DREN_jg4902.t1 pyridoxal phosphate binding-IEA;catalytic activity-IEA;biosynthetic process-IEA;glycine C-acetyltransferase activity-IEA;transfer

DREN_jg5058.t1 myosin complex-IEA;nucleotide binding-IEA;cytoplasm-IEA;actin binding-IEA;actin filament binding-IEA;myosin filament-IEA;m

DREN_jg5123.t1;DREN_g2727.t1 oxidoreductase activity-IEA;oxidoreductase activity-IEA

DREN_jg525.t1

DREN_jg5261.t1;DREN_g2854.t1 chitin binding-IEA;extracellular region-IEA;chitin binding-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;extracellula

DREN_jg5283.t1 structural constituent of ribosome-IEA;determination of adult lifespan-IEA;ribosome-IEA;translation-IEA

DREN_jg5288.t1

DREN_jg5425.t1 nucleotide binding-IEA;mitochondrion-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;phosphorylation-IEA;transfer

DREN_jg5647.t1;DREN_g957.t1 endoplasmic reticulum membrane-IEA;endoplasmic reticulum membrane-IBA;endoplasmic reticulum membrane-IDA;endopla

DREN_jg612.t1 vesicle-mediated transport-IEA;syntaxin binding-IBA;membrane-IEA;SNARE complex disassembly-IBA;soluble NSF attachment

DREN_jg673.t1 glycosyltransferase activity-IEA;mannosylation-IEA;dolichyl-phosphate beta-D-mannosyltransferase activity-IEA;transferase ac

DREN_jg6861.t1;DREN_g4249.t1 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase activity-IEA;nucleotide binding-IEA;RNA binding-IEA;oxidoreductase activity-IEA;met

DREN_jg7119.t1 structural constituent of ribosome-IEA;ribosome-IEA;translation-IEA

DREN_jg7168.t1 membrane-IEA;integral component of membrane-IEA

DREN_jg7240.t1 nucleotide binding-IEA;cytoplasm-IEA;cytoplasm-IBA;'de novo' pyrimidine nucleobase biosynthetic process-IEA;phosphorylatio

DREN_jg727.t1 carbohydrate derivative binding-IEA;carbohydrate derivative metabolic process-IEA;transaminase activity-IEA;glutamine-fruct

DREN_jg7316.t1 cytoskeleton-IEA;GTP binding-IEA;GTP binding-IBA;nucleotide binding-IEA;cytoplasm-IEA;cytoplasm-IBA;GTPase activity-IEA;cy

DREN_jg7333.t1;DREN_g8529.t1 chitin binding-IEA;extracellular region-IEA;chitin binding-IEA;extracellular region-IEA

DREN_jg7409.t1 proteolysis-IEA;cysteine-type peptidase activity-IEA

DREN_jg7698.t2;DREN_jg7698.t1;D RNA binding-IEA;metal ion binding-IEA;RNA-directed 5'-3' RNA polymerase activity-IEA;histone methyltransferase activity-IEA;

DREN_jg7781.t1 nucleotide binding-IEA;cytoplasm-IEA;regulation of protein stability-IEA;proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein ca

DREN_jg7872.t1 nucleotide binding-IEA;mitochondrion-IEA;nicotinamide nucleotide metabolic process-IEA;ATP-dependent NAD(P)H-hydrate d

DREN_jg7880.t1 extracellular region-IEA

DREN_jg7882.t1

DREN_jg7883.t1 extracellular region-IEA

DREN_jg8540.t1;DREN_g5917.t1 metabolic process-IEA;fucose metabolic process-IEA;fucose metabolic process-IBA;alpha-L-fucosidase activity-IEA;alpha-L-fuco

DREN_jg8853.t1 membrane-IEA;integral component of membrane-IEA

DREN_jg8884.t1 DREN_jg9045.t1 DREN_jg9094.t1

DREN_jg9495.t1;DREN_g1226.t1 membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;positive regulation of plasminogen activation-IEA;integral component o

DREN_jg9694.t1;DREN_g6843.t1 chitin binding-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;extracellular region-IEA;chitin binding-IEA;membrane

DREN_jg9747.t1 RNA binding-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;calcium ion binding-IEA

LPC-Esófago

Protein IDs	Mapping GO Term
DREN_g1029.t1	zinc ion binding-IEA;metal ion binding-IEA;lyase activity-IEA;carbonate dehydratase activity-IEA
DREN_jg3063.t1;DREN_g1545.t1	growth cone-IEA;cytoplasm-IEA;vesicle-mediated transport-IEA;extracellular space-IEA;membrane-IEA;protein local
DREN_g175.t1;DREN_jg1708.t1;DREN_jg17	nucleotide binding-IEA;cytoplasm-IEA;membrane-IEA;post-embryonic body morphogenesis-IEA;integral component
DREN_jg5523.t1;DREN_g1801.t1	actin binding-IEA;actin binding-IEA
DREN_g1854.t1;DREN_jg47.t1	glutathione oxidoreductase activity-IEA;glutathione-disulfide reductase (NADPH) activity-IEA;cellular oxidant detoxi
DREN_g209.t1;DREN_jg1748.t1	extracellular space-IEA;serine-type endopeptidase inhibitor activity-IEA;membrane-IEA;integral component of mem
DREN_g2146.t1;DREN_jg242.t1	calcium ion binding-IEA;membrane-IEA;calcium ion binding-IEA;integral component of membrane-IEA

DREN_g227.t1;DREN_jg1770.t1 endopeptidase inhibitor activity-IEA;cysteine-type endopeptidase inhibitor activity-IEA;negative regulation of endo

DREN_g2307.t1 catalytic activity-IEA;glycolytic process-IEA;membrane-IEA;lyase activity-IEA;integral component of membrane-IEA;f

DREN_g2316.t1;DREN_jg2106.t1 lipid transport-IEA;lipid transporter activity-IEA;lipid transporter activity-IBA;membrane-IEA;integral component of

DREN_g2438.t1;DREN_jg2201.t1 nucleotide binding-IEA;GTP binding-IEA;vesicle-mediated transport-IEA;GTPase activity-IEA;protein transport-IEA;G

DREN_g2496.t1 actin filament binding-IEA;actin binding-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;actin cytoskeleton

DREN_g3170.t1;DREN_jg4917.t1

DREN_jg10437.t1;DREN_g3559.t1 misfolded protein binding-IEA;misfolded protein binding-IBA;endoplasmic reticulum membrane-IEA;endoplasmic re

DREN_g3589.t1 serine-type endopeptidase inhibitor activity-IEA;negative regulation of endopeptidase activity-IEA;peptidase inhibit

DREN_g4052.t1;DREN_jg6632.t1 cysteine-type endopeptidase inhibitor activity-IEA;negative regulation of endopeptidase activity-IEA;cysteine-type e

DREN_jg6970.t1;DREN_g4352.t1 tRNA aminoacylation for protein translation-IEA;nucleotide binding-IEA;cytoplasm-IEA;aminoacyl-tRNA ligase activit

DREN_g460.t1;DREN_jg9873.t1 RNA binding-IEA;RNA splicing-IEA;structural constituent of ribosome-IEA;regulation of transcription, DNA-template

DREN_g4603.t1;DREN_jg7083.t1 nucleotide binding-IEA;citrate dehydratase activity-IEA;metal ion binding-IEA;mitochondrion-IEA;Mre11 complex-IE

DREN_jg616.t1;DREN_jg616.t2;DREN_jg61 cytoplasm-IBA;cell surface-IEA;protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase activity-IEA;protein-L-isoas

DREN_g4848.t1;DREN_jg2492.t1 metal ion binding-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;heme binding-IEA;perinuclear region o

DREN_g5072.t1;DREN_jg8243.t1 metal ion binding-IEA;structural constituent of eye lens-IEA;metal ion binding-IEA;structural constituent of eye lens

DREN_g5113.t1;DREN_jg8285.t1 epithelial cell differentiation-IEA;endoplasmic reticulum membrane-IEA;autophagy-IEA;negative regulation of coagu

DREN_g5748.t1;DREN_jg10514.t1 small GTPase binding-IEA;intracellular protein transport-IEA;small GTPase binding-IEA;intracellular protein transpor

DREN_g5798.t1;DREN_jg10569.t1;DREN_jg DNA binding-IEA;nucleotidyltransferase activity-IEA;DNA-directed 5'-3' RNA polymerase activity-IEA;zinc ion binding DREN_g6458.t1;DREN_jg9916.t1

DREN_g6967.t1;DREN_jg3698.t1 cytoplasm-IEA;glycogen biosynthetic process-IEA;catalytic activity-IEA;membrane-IEA;integral component of memb DREN_g783.t1;DREN_jg9157.t1 osteoclast differentiation-IEA;zinc ion binding-IEA;metal ion binding-IEA;cytosol-IEA;lyase activity-IEA;negative regu

DREN_jg7410.t1;DREN_g8600.t1 collagen trimer-IEA;collagen trimer-IEA

DREN_g8622.t1;DREN_jg7435.t1 serine-type endopeptidase inhibitor activity-IEA;extracellular space-IEA;membrane-IEA;integral component of mem

DREN_g8630.t1;DREN_jg7444.t1 mitochondrion-IEA;carbohydrate metabolic process-IEA;mitochondrion-IEA;carbohydrate metabolic process-IEA

DREN_g871.t1;DREN_jg5562.t1;DREN_jg55 membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;memb

DREN_jg7200.t1;DREN_g8976.t1;DREN_jg1 TPR domain binding-IEA;nucleotide binding-IEA;pole plasm mRNA localization-IEA;cytoplasm-IEA;centrosome-IEA;re

DREN_jg2374.t1;DREN_g9055.t1 serine-type endopeptidase inhibitor activity-IEA;extracellular space-IEA;membrane-IEA;integral component of mem

DREN_g9246.t1;DREN_jg3608.t1 membrane-IEA;integral component of membrane-IEA

DREN_g9346.t1;DREN_jg8340.t1 nucleotide binding-IEA;cell division-IEA;ATP hydrolysis activity-IEA;hydrolase activity-IEA;ATP binding-IEA;nucleotide

DREN_jg6802.t1;DREN_g9350.t1;DREN_jg8 cytoplasm-IEA;cytoplasm-IBA;ubiquitin protein ligase binding-IBA;structural constituent of ribosome-IEA;structural

DREN_jg162.t1;DREN_g9446.t1

DREN_jg5636.t1;DREN_g945.t1 phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) activity-IEA;gluconeogenesis-IEA;nucleotide binding-IEA;GTP binding-IEA

DREN_g9554.t1;DREN_jg7838.t2;DREN_jg7 chitin binding-IEA;catalytic activity-IEA;carbohydrate metabolic process-IEA;hydrolase activity, acting on carbon-nitr

DREN_jg10040.t1 protein disulfide isomerase activity-IEA;endoplasmic reticulum-IEA;endoplasmic reticulum lumen-IEA;isomerase act DREN_jg10109.t1

DREN_jg10307.t1;DREN_g8513.t1 superoxide metabolic process-IEA;antioxidant activity-IEA;oxidoreductase activity-IEA;metal ion binding-IEA;remova

DREN_jg10309.t1 superoxide metabolic process-IEA;antioxidant activity-IEA;metal ion binding-IEA;oxidoreductase activity-IEA;copper

DREN_jg10477.t1 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity-IEA;protein peptidyl-prolyl isomerization-IEA;Hsp90 protein binding-IEA;i

DREN_jg1051.t1 cytoplasm-IEA;glycogen biosynthetic process-IEA;catalytic activity-IEA;membrane-IEA;integral component of memb

DREN_jg1052.t1;DREN_jg2812.t1 cytoplasm-IEA;glycogen biosynthetic process-IEA;catalytic activity-IEA;membrane-IEA;integral component of memb

DREN_jg10578.t1;DREN_jg10572.t1 positive regulation of cell growth-IEA;muscle cell differentiation-IEA;oogenesis-IEA;osteoblast differentiation-IEA;ne

DREN_jg1368.t1

DREN_jg1399.t1 carbohydrate binding-IEA

DREN_jg1462.t1 cytoskeleton-IEA;nucleotide binding-IEA;GTP binding-IEA;GTP binding-IBA;cytoplasm-IEA;cytoplasm-IBA;GTPase act

DREN_jg1486.t1 cytoskeleton-IEA

DREN_jg1581.t1;DREN_g4913.t1

DREN_jg1583.t1 metal ion binding-IEA;peptidase activity-IEA;proteolysis-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;

DREN_jg1603.t1 gluconeogenesis-IEA;gluconeogenesis-IBA;catalytic activity-IEA;cell redox homeostasis-IEA;glycolytic process-IEA;gly

DREN_jg1618.t1 post-embryonic development-IEA;palmitoyl hydrolase activity-IEA;palmitoyl-(protein) hydrolase activity-IEA;oviposi

DREN_jg208.t1 nucleotide binding-IEA;oxidoreductase activity-IEA;NAD binding-IEA;NADP binding-IEA;glycolytic process-IEA;glycer

DREN_jg2108.t1;DREN_g2317.t1 nucleotide binding-IEA;membrane-IEA;glycolytic process-IEA;phosphoglycerate kinase activity-IEA;integral compon

DREN_jg2242.t1

DREN_jg2259.t1;DREN_g2495.t1 actin filament binding-IEA;actin binding-IEA;actin cytoskeleton organization-IEA;ATP binding-IEA

DREN_jg2277.t2;DREN_jg2277.t1;DREN_g2 membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;memb

DREN_jg2303.t1 cytoskeleton-IEA;nucleotide binding-IEA;GTP binding-IEA;cytoplasm-IEA;GTPase activity-IEA;cytoskeleton organizati

DREN_jg2306.t1;DREN_g2533.t1 membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA

DREN_jg2335.t1 cytoskeleton-IEA;GTP binding-IEA;GTP binding-IBA;nucleotide binding-IEA;cytoplasm-IEA;cytoplasm-IBA;GTPase act

DREN_jg2362.t1

DREN_jg2462.t1;DREN_g9132.t1 metabolic process-IEA;alpha-mannosidase activity-IEA;alpha-mannosidase activity-IBA;metal ion binding-IEA;catalyt

DREN_jg2464.t1;DREN_g9133.t1 nucleotide binding-IEA;cytoplasm-IEA;mitochondrial matrix-IEA;aminoacyl-tRNA ligase activity-IEA;oxidoreductase a

DREN_jg2483.t1;DREN_g4839.t1 membrane raft-IEA;cytosol-IBA;membrane-IEA;protein deglycation, glyoxal removal-IBA;single fertilization-IEA;prot

DREN_jg2570.t1;DREN_jg2732.t1;DREN_g2 protein dimerization activity-IEA;protein dimerization activity-IEA;protein dimerization activity-IEA

DREN_jg2731.t1 cell surface-IEA;protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase activity-IEA;cellular protein modification p DREN_jg2909.t1;DREN_g3679.t1 ubiquitin binding-IEA;protein transport-IEA;phosphatidylinositol binding-IEA

DREN_jg2988.t1;DREN_g1484.t1 nucleotide binding-IEA;peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity-IEA;membrane-IEA;integral component of memb

DREN_jg3020.t1 GTP binding-IEA;mitochondrion-IEA;RNA processing-IEA;GTPase activity-IEA;membrane-IEA;mRNA processing-IEA;n

DREN_jg3312.t1;DREN_jg3312.t2;DREN_jg glucose binding-IEA;nucleotide binding-IEA;cellular glucose homeostasis-IEA;glucose 6-phosphate metabolic proces

DREN_jg3446.t1 cytoplasm-IEA;'de novo' pyrimidine nucleobase biosynthetic process-IEA;ATP metabolic process-IEA;phosphorylatio DREN_jg3471.t1 membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;carbohydrate binding-IEA

DREN_jg3495.t1

DREN_jg3578.t1 serine-type endopeptidase inhibitor activity-IEA;extracellular space-IEA;extracellular space-IBA;membrane-IEA;inte

DREN_jg3651.t1;DREN_g9284.t1 nucleotide binding-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;ATP binding-IEA;nucleotide binding-IE

DREN_jg3858.t1 nucleotide binding-IEA;RNA helicase activity-IEA;ATP hydrolysis activity-IEA;hydrolase activity, acting on acid anhyd

DREN_jg389.t1;DREN_g389.t2 metal ion binding-IEA;calcium ion binding-IEA;endoplasmic reticulum-IEA;unfolded protein binding-IEA;endoplasmic

DREN_jg3892.t1;DREN_g7140.t1

DREN_jg3895.t1 cytoplasm-IEA;guanyl-nucleotide exchange factor activity-IEA;small GTPase mediated signal transduction-IEA;regula

DREN_jg4169.t1 nucleotide binding-IEA;malate metabolic process-IEA;structural constituent of ribosome-IEA;oxidoreductase activity

DREN_jg4251.t1;DREN_g8401.t1 phosphopyruvate hydratase activity-IEA;magnesium ion binding-IEA;glycolytic process-IEA;lyase activity-IEA;phosph

DREN_jg4410.t1;DREN_g6196.t1 cytoskeleton-IEA;protein folding chaperone-IEA;nucleotide binding-IEA;cytoplasm-IEA;centrosome-IEA;cell body-IEA

DREN_jg4469.t1 nucleotide binding-IEA;oxidoreductase activity-IEA;oxidoreductase activity, acting on the CH-NH2 group of donors, DREN_jg4525.t1

DREN_jg4666.t1;DREN_g1934.t1 cell communication-IEA;membrane-IEA;calcium ion binding-IEA;integral component of membrane-IEA;cell different

DREN_jg4733.t1

DREN_jg4827.t1 GTP biosynthetic process-IEA;nucleotide binding-IEA;CTP biosynthetic process-IEA;nucleoside diphosphate phospho

DREN_jg4894.t1 iron ion homeostasis-IEA;iron ion binding-IEA;extracellular space-IEA;metal ion binding-IEA;membrane-IEA;integral

DREN_jg4902.t1 pyridoxal phosphate binding-IEA;catalytic activity-IEA;biosynthetic process-IEA;glycine C-acetyltransferase activity-I

DREN_jg5068.t1 mRNA cleavage and polyadenylation specificity factor complex-IEA;RNA binding-IEA;oxidoreductase activity-IEA;FM

DREN_jg51.t1 peptidase activity-IEA;proteolysis-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;cysteine-type peptidas

DREN_jg5137.t1;DREN_g2740.t1 thymidylate synthase (FAD) activity-IEA;viral release from host cell-IEA;DNA biosynthetic process-IEA;DNA recombin

DREN_jg5212.t1;DREN_g2814.t1 glutathione metabolic process-IEA;transferase activity-IEA;glutathione metabolic process-IEA;glutathione metabolic

DREN_jg5442.t1 nucleotide binding-IEA;cytoplasm-IEA;metal ion binding-IEA;catalytic activity-IEA;phosphoglycerate mutase activity-

DREN_jg5446.t1;DREN_jg9171.t1 DNA binding-IEA;protein heterodimerization activity-IEA;chromosome-IEA;nucleosome-IEA;nucleus-IEA

DREN_jg5541.t1 nucleotide binding-IEA;malate metabolic process-IEA;structural constituent of ribosome-IEA;oxidoreductase activity

DREN_jg5568.t1 cytoplasm-IEA;peptidase activity-IEA;cytosol-IEA;proteolysis-IEA;cysteine-type peptidase activity-IEA;hydrolase acti

DREN_jg5691.t1 oxygen binding-IEA;oxygen transport-IEA;heme binding-IEA;oxygen carrier activity-IEA

DREN_jg5692.t1 oxygen binding-IEA;oxygen transport-IEA;heme binding-IEA;oxygen carrier activity-IEA

DREN_jg5725.t1;DREN_g1032.t1 PAS complex-IEA;membrane-IEA;phosphatidylinositol biosynthetic process-IEA;PAS complex-IEA;membrane-IEA;ph

DREN_jg5880.t1 transmembrane transport-IEA;mitochondrial ADP transmembrane transport-IEA;mitochondrial ATP transmembran

DREN_jg599.t1;DREN_g8864.t1 metal ion binding-IEA;peptidase activity-IEA;proteolysis-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;m

DREN_jg6114.t1 oxygen binding-IEA;oxygen transport-IEA;heme binding-IEA;oxygen carrier activity-IEA

DREN_jg612.t1 vesicle-mediated transport-IEA;syntaxin binding-IBA;membrane-IEA;SNARE complex disassembly-IBA;soluble NSF at

DREN_jg614.t1 actin binding-IEA;membrane-IEA;actin filament depolymerization-IEA;integral component of membrane-IEA;actin c DREN_jg6171.t1;

DREN_g4376.t1 basement membrane-IEA;cell-matrix adhesion-IEA;cell adhesion-IEA;membrane-IEA;calcium ion binding-IEA;integra DREN_jg6211.t1;

DREN_g4408.t1 protein disulfide isomerase activity-IEA;metal ion binding-IEA;endoplasmic reticulum-IEA;isomerase activity-IEA;end

DREN_jg6358.t1;DREN_g8074.t1 magnesium ion binding-IEA;cytoplasm-IBA;ribose phosphate diphosphokinase activity-IEA;purine nucleotide biosyn

DREN_jg641.t1;DREN_g4702.t1;DREN_g47 intermediate filament-IEA;intermediate filament-IEA

DREN_jg6426.t1;DREN_g3886.t1 metabolic process-IEA;fucose metabolic process-IEA;alpha-L-fucosidase activity-IEA;carbohydrate metabolic proces

DREN_jg6490.t1;DREN_g3932.t1 aldehyde dehydrogenase (NAD+) activity-IEA;aldehyde dehydrogenase (NAD+) activity-IBA;3-deoxyglucosone dehyd

DREN_jg65.t1;DREN_jg65.t2 cell surface-IEA;extracellular region-IEA;cell surface-IEA;extracellular region-IEA

DREN_jg6631.t1 cysteine-type endopeptidase inhibitor activity-IEA;negative regulation of endopeptidase activity-IEA DREN_jg6690.t1 nucleosome assembly-IEA;nucleus-IEA

DREN_jg6819.t1;DREN_g4206.t1 cytoplasm-IEA;proteasome core complex-IEA;proteasome core complex, alpha-subunit complex-IEA;proteasome co

DREN_jg6838.t1 glutathione metabolic process-IEA;translation elongation factor activity-IEA;translational elongation-IEA;translation

DREN_jg6900.t1;DREN_g4285.t1;CON EN cytoskeleton-IEA;GTP binding-IEA;GTP binding-IBA;nucleotide binding-IEA;cytoplasm-IEA;cytoplasm-IBA;regulation

DREN_jg6991.t1;DREN_g9021.t1;DREN_g9 phosphatidylserine binding-IEA;phosphatidylserine binding-IBA;cytoplasm-IBA;phosphatidylethanolamine binding-I

DREN_jg7020.t2;DREN_jg7020.t1;DREN_g4 endopeptidase inhibitor activity-IEA;extracellular space-IEA;serine-type endopeptidase inhibitor activity-IEA;membr

DREN_jg7082.t1;DREN_g4602.t1 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity-IEA;peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity-IBA;cytoplasm-IBA;intrace

DREN_jg7088.t1;DREN_g4608.t1 phosphatase activity-IEA;dephosphorylation-IEA;inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate 5-phosphatase activity-IEA;phos

DREN_jg7091.t1

DREN_jg7230.t1 extracellular space-IBA;peptidase activity-IEA;proteolysis-IEA;regulation of catalytic activity-IEA;cysteine-type endo

DREN_jg7232.t1 oxygen binding-IEA;oxygen transport-IEA;heme binding-IEA;oxygen carrier activity-IEA

DREN_jg7316.t1 cytoskeleton-IEA;GTP binding-IEA;GTP binding-IBA;nucleotide binding-IEA;cytoplasm-IEA;cytoplasm-IBA;GTPase act DREN_jg7401.t1;DREN_g8591.t1;DREN_g8 intermediate filament-IEA;intermediate filament-IEA

DREN_jg7486.t1 nucleotide binding-IEA;cytoplasm-IEA;cytosol-IEA;unfolded protein binding-IEA;ATP binding-IEA;chaperonin-contain

DREN_jg772.t1;DREN_jg2064.t1 nucleotide binding-IEA;GTP binding-IEA;cytoplasm-IEA;translation elongation factor activity-IEA;GTPase activity-IEA

DREN_jg7781.t1 nucleotide binding-IEA;cytoplasm-IEA;regulation of protein stability-IEA;proteasome-mediated ubiquitin-dependen DREN_jg7880.t1 extracellular region-IEA

DREN_jg8118.t1;DREN_g1414.t1 glutathione metabolic process-IEA;glutathione metabolic process-IBA;zinc ion binding-IEA;metal ion binding-IEA;tra DREN_jg8150.t1 membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;cell surface-IEA;extracellular region-IEA

DREN_jg8315.t1

DREN_jg8316.t1;DREN_g7825.t1 lipid transport-IEA;lipid transporter activity-IEA;nutrient reservoir activity-IEA;lipid transport-IEA;lipid transporter ac

DREN_jg8463.t1 magnesium ion binding-IEA;intramolecular transferase activity, phosphotransferases-IEA;metal ion binding-IEA;orga

DREN_jg8534.t1;CON Q3ZBD7 gluconeogenesis-IEA;glycolytic process-IEA;isomerase activity-IEA;glucose-6-phosphate isomerase activity-IEA

DREN_jg882.t1 response to oxidative stress-IEA;peroxidase activity-IEA;oxidoreductase activity-IEA;heme binding-IEA;cellular oxida

DREN_jg8968.t1 proteasome complex-IEA;proteasome assembly-IEA

DREN_jg8978.t1 membrane-IEA;integral component of membrane-IEA

DREN_jg9548.t1 defense response to tumor cell-IEA;negative regulation of T cell differentiation-IEA;response to oxidative stress-IEA;

DREN_jg9597.t1 calcium ion binding-IEA;ATPase-IEA;RNA processing-IEA;unfolded protein binding-IEA;unfolded protein binding-IBA;

DREN_jg9747.t1 RNA binding-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;calcium ion binding-IEA

DREN_jg9786.t1 vacuolar transport-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA

DREN_jg9861.t1 Set1C/COMPASS complex-IEA;Set1C/COMPASS complex-IBA;chromosome, telomeric region-IEA;MLL3/4 complex-IE

DREN_jg9893.t1;DREN_g479.t1 nucleotide binding-IEA;transmembrane transport-IEA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;ABC-ty ization to axon of membrane fication-IEA;glu brane-IEA;extr peptidase activ ructose-bispho membrane-IEA olgi apparatus- n organization ticulum unfold or activity-IEA; ndopeptidase y-IEA;membra d-IEA;mRNA pr A;4 iron, 4 sulf partate (D-asp f cytoplasm-IE IEAlation-IEA;neg t-IEA-IEA;transcript rane-IEA;beta- lation of apopt brane-IEA;extrrane-IEA;integr sponse to hea brane-IEA;extrbinding-IEA;c constituent of;metal ion bin ogen (but not ivity-IEA) of superoxid ion binding-IB somerase acti rane-IEA;beta- rane-IEA;beta- gative regulate ivity-IEA;cytos NA integratio colytic proces tion-IEA;protei aldehyde-3-ph ent of membra rane-IEA;integr on-IEA;structu ivity-IEA;cytos ic activity-IEA; ctivity-IEA;mit ein deglycase rocess-IEA;merane-IEA;prote ucleus-IEA;mit s-IEA;phospho n-IEA;transfer gral componen A;membrane-I rides-IEA;mem c reticulum lumtion of catalyt-IEA;catalytic opyruvate hyd;microtubule NAD or NADP aiation-IEA rylation-IEA;m component of EA;transferase N binding-IEA; e activity-IEA;h ation-IEA;G pr process-IBA;tr IEA;lipid meta-IEA;catalytic vity-IEA;pyroglosphatidylinosi e transport-IEA etallopeptidattachment prot ytoskeleton-IEI component o oplasmic retic thetic process-s-IEA;hydrolas rogenase activmplex-IEA;pro-IEAof GTPase activ EA;phosphatid ane-

IEA;integr llular membra phatidylinositopeptidase activ ivity-IEA;cytosing T-complex;translational e t protein catabnsferase activitvity-IEA;nutr nic substantcent detoxificatirespiratory bu phosphatidylinA;chromatin s pe transporter

Macho-Hembra

Protein IDs Mapping GO Term

DREN_g2316.t1; lipid transport-IEA;lipid transporter activity-IEA;lipid transporter activity-IBA;membrane-IEA;integral component of membrane-IEA

DREN_g6540.t1; membrane-IEA;integral component of membrane-IEA;methyltransferase activity-IBA;membrane-IEA;integral component of memb

DREN_jg7398.t1; positive regulation of sarcomere organization-IEA;phosphatase binding-IEA;striated muscle dense body-IEA;membrane-IEA;integr

DREN_jg10365.t lipid transport-IEA;lipid transporter activity-IEA;lipid transporter activity-IBA;extracellular region-IEA;nutrient reservoir activity-IEA

DREN_jg2025.t1 biological_process-ND; cellular_component-ND;molecular_function-ND

DREN_jg7698.t2; RNA binding-IEA;metal ion binding-IEA;RNA-directed 5'-3' RNA polymerase activity-IEA;histone methyltransferase activity-IEA;hist