



**FCQ**  
Facultad de  
Ciencias Químicas



Universidad  
Nacional  
de Córdoba

Universidad Nacional de Córdoba  
Facultad de Ciencias Químicas

*Tesis para acceder al título de Doctor en Ciencias Químicas*

**Vesículas extracelulares de *Giardia lamblia*:  
Análisis proteómico y mecanismos involucrados  
en la formación y liberación de exosomas**

Mic. Sofía Moyano

Directora: Dra. María Carolina Touz

Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra

INIMEC-CONICET-UNC

Córdoba, Argentina - 2020

## COMISIÓN ASESORA

Dra. María Carolina Touz, Instituto de Investigaciones Médicas Mercedes y Martín Ferreyra, INIMEC-CONICET-UNC.

Dra. Belckys Maletto, Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología, CIBICI-CONICET-UNC. Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología.

Dra. Cecilia Álvarez, Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología, CIBICI-CONICET-UNC. Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología.

Dra. María Ana Contín, Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba, CIQUIBIC-CONICET-UNC. Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Biológica.

## TRIBUNAL

Dra. Belckys Maletto .....

Dra. Cecilia Álvarez .....

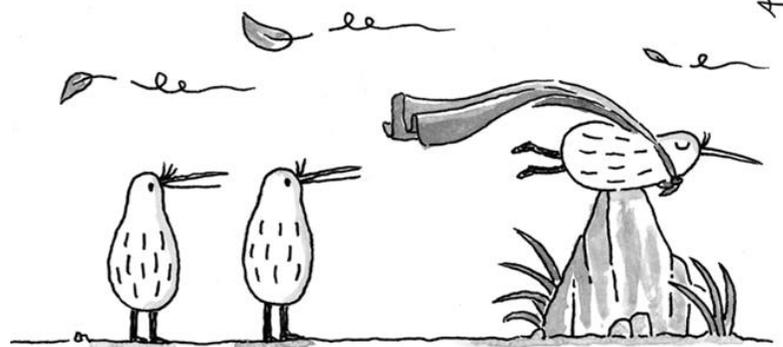
Dra. María Ana Contín .....

Dra. Andrea Cumino .....

## DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

**27 de Abril de 2020**

"KIWI ILUMINADO"



alato @aldotonelli

-NO DEJES DE SOÑAR...

## *Agradecimientos*

En primer lugar, quiero agradecer a las jefas del LabMI por todo lo que me han enseñado durante estos 5 años, su contención en todo momento, sus palabras, su amabilidad y su generosidad, que me ayudaron a crecer en el ámbito científico y además como persona. Principalmente a Caro, mi directora, por haberme dado la oportunidad de unirme a su grupo de trabajo. Gracias por el apoyo brindado, por ayudarme a conseguir mis objetivos y a no desanimarme en los momentos en que nada parecía salir bien. También, me gustaría agradecerle a Andre por su importante aporte en mi formación y la participación activa en el desarrollo de esta tesis.

A todos mis compañeros del LabMI, los presentes y pasados: Gon, Lore, Agos, Juli, Lu, Coty, Nahuel y Nati, gracias por todos los momentos compartidos, el apoyo brindado durante todo este tiempo, la contención en los momentos más difíciles y por hacer del laboratorio un espacio más entretenido y distendido para investigar. Quiero agradecer especialmente a Gon por ser mi amigo, gracias por los momentos compartidos y por estar siempre dispuesto a escucharme y aconsejarme. A Lore, gracias por la amistad y compañerismo, por tu ayuda desinteresada y por estar siempre que lo necesité.

A todos los integrantes del IMMF, tanto a investigadores, técnicos, becarios, tesinistas y personal administrativo.

A la Dra. Adriana Lanfredi-Rangel y a todo su grupo de trabajo por recibirme en su laboratorio y poner todo a disposición para que mi estadia fuera productiva, otorgando un aporte fundamental a este trabajo de tesis.

To Dr. Marco Lalle and all the members from his department, specially to Serena and Maria Luisa, for the opportunity, dedication and make me feel as part of their team. A special feeling of gratitude to Ilaria, who helped me from the first day with the experiments, for her friendship, generosity, kindness and support.

A Gonzalo Quasollo y Carolina Leimgruber por su asistencia técnica en microscopía.

A la comisión asesora, Dras. Belckys Maletto, Cecilia Álvarez y María Ana Contín por haberme acompañado en este proceso. También a la Dra. Andrea Cumino por haber aceptado evaluar este trabajo.

A la UNC, CONICET, FONCyT y al programa IUBMB-Wood Whelan Research que hicieron posible el desarrollo de este trabajo.

A mis amigos, especialmente a los de la Universidad, los cuáles fueron un gran apoyo para lograr este objetivo.

A mi familia, por ser un pilar fundamental, no solo para completar esta etapa, sino también son indispensables para lograr todos mis proyectos y sueños personales.

A Ale, por acompañarme en todo momento. Gracias por el amor y la paciencia.

*¡Muchas gracias a todos!*

## Indice

Publicaciones en revistas internacionales.....	1
Presentaciones a congresos .....	1
Abreviaturas .....	3
Resumen.....	5
Abstract .....	6
1. INTRODUCCIÓN GENERAL .....	8
1.1 HISTORIA DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES .....	8
1.2 CLASIFICACIÓN DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES .....	10
1.3 BIOGÉNESIS DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES .....	11
1.3.1 Formación de exosomas.....	12
1.3.1.1 Mecanismo dependiente de ESCRT .....	13
1.3.1.2 Mecanismos independientes de ESCRT .....	14
1.3.1.2.1 <i>Mecanismo independiente de ESCRT que involucra a las tetraspaninas</i> .....	14
1.3.1.2.2 <i>Mecanismo independiente de ESCRT que involucra lípidos</i> .....	14
1.4 MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA LIBERACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES .....	15
1.4.1 Liberación de exosomas .....	15
1.5 COMPOSICIÓN MOLECULAR DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES .....	16
1.5.1 Proteínas presentes en los exosomas .....	17
1.5.2 Lípidos presentes en los exosomas .....	18
1.5.3 Ácidos nucleicos presentes en los exosomas .....	18
1.6 FUNCIONES GENERALES DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES .....	20
1.7 LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES EN ENFERMEDADES PARASITARIAS.....	20
1.8 <i>Giardia lamblia</i> .....	22
1.8.1 Giardiasis, la enfermedad .....	22
1.8.2 Transporte de proteínas .....	24
1.8.2.1 Sistema endosomal/lisosomal en <i>Giardia lamblia</i> : Vacuolas periféricas.....	24
1.8.3. Maquinaria ESCRT en <i>Giardia lamblia</i> .....	26
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	30

2.1 HIPÓTESIS .....	30
2.2 OBJETIVO GENERAL .....	30
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
3.1 ORGANISMOS Y CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	32
3.1.1 Aislamiento de vesículas extracelulares utilizando el medio M199 modificado .....	32
3.1.2 Tinción negativa de vesículas extracelulares.....	32
3.1.3 Recuento de la viabilidad celular.....	33
3.1.4 Espectrometría de masa.....	33
3.1.5 Aislamiento selectivo de vesículas tipo exosomas utilizando el medio TYI-S-33 carente de suero bovino adulto o bilis bovina (TYI-S-33/-sbb) .....	34
3.1.6 Dispersión dinámica de la luz (DLS).....	35
3.1.7 Gradiente de sacarosa .....	35
3.2 MANIPULACIÓN DEL ADN .....	35
3.2.1 Obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico y plasmídico de <i>Giardia lamblia</i> .....	35
3.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa, purificación y corte con enzimas de restricción de los fragmentos de ADN.....	36
3.2.3 Ligación de fragmentos de ADN .....	37
3.2.4 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa .....	37
3.3 CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN EN <i>Giardia lamblia</i> .....	38
3.3.1 Amplificación y sobreexpresión de las proteínas GIVps4a y GIRab11 .....	38
3.3.2 Mutagénesis sitio dirigida y sobreexpresión de la mutante GIVps4a <sub>E228Q</sub> .....	39
3.3.3 Inhibición de la expresión de GIVps4a en <i>Giardia lamblia</i> .....	40
3.3.4 Inhibición de la expresión de GIRab11 en <i>Giardia lamblia</i> .....	40
3.3.5 Secuenciación de moléculas de ADN.....	42
3.4 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS .....	42
3.4.1 Método de transformación bacteriana .....	42
3.4.2 Transformación de <i>Escherichia coli</i> .....	42
3.5 TRANSFECCIÓN DE TROFOZOÍTOS DE <i>Giardia lamblia</i> CEPA WB/1267.....	42
3.6 RETROTRANSCRIPCIÓN SEGUIDA DE PCR EN TIEMPO REAL .....	43
3.6.1 Extracción de ARN total.....	43

3.6.2 Síntesis de ADNc .....	43
3.6.3 PCR en tiempo real ( <i>qRT-PCR</i> ) .....	43
3.7 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS .....	44
3.8 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE).....	44
3.9 ENSAYOS DE INMUNODETECCIÓN .....	45
3.9.1. Inmunodetección de proteínas mediante la técnica de <i>Western blot</i> .....	45
3.9.2 Inmunodetección de proteínas mediante la técnica de inmunofluorescencia (IF).....	46
3.10 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.....	47
4. RESULTADOS.....	50
PARTE I: Caracterización de las vesículas extracelulares de dos cepas con diferente patogenicidad de <i>Giardia lamblia</i> .....	50
4.1.1 Los ensamblajes A y B de <i>Giardia lamblia</i> liberan al medio extracelular vesículas del tipo microvesículas y exosomas .....	52
4.1.2 Las vesículas extracelulares de <i>Giardia lamblia</i> seleccionan específicamente el contenido proteico .....	54
4.1.2.1 Análisis proteómico de vesículas extracelulares de la cepa WB/C6.....	55
4.1.2.2 Análisis proteómico de vesículas extracelulares de la cepa GS/H7.....	57
4.1.3 Las vesículas extracelulares de <i>Giardia lamblia</i> liberan proteínas que carecen de péptido señal .....	58
4.1.4 Las vesículas extracelulares de los ensamblajes A y B poseen proteínas típicas de vesículas extracelulares y otras particulares del parásito.....	59
4.1.5 Las vesículas tipo exosomas del ensamblaje A están enriquecidas en proteínas de la maquinaria ESCRT.....	62
4.1.6 Discusión.....	64
PARTE II: Rol de GIVps4a y GIRab11 en la formación y liberación de vesículas tipo exosomas en <i>Giardia lamblia</i> . .....	69
4.2.1 <i>Giardia lamblia</i> secreta vesículas con características de exosomas en el medio TYI-S-33 carente de suero bovino adulto y bilis bovina .....	70
4.2.2 Formación y liberación de exosomas en <i>Giardia lamblia</i> .....	75
4.2.2.1 GIVps4a está involucrada en la formación de vesículas intraluminares y vesículas del tipo exosomas. ....	76
4.2.2.1.1 <i>GIVps4a-HA</i> posee una distribución reticular en trofozoítos .....	76

4.2.2.1.2 <i>La disminución de la expresión de GIVps4a altera la liberación de vesículas tipo exosomas en Giardia lamblia.</i> .....	76
4.2.2.1.3 <i>La función ATPasa de Glvps4a es clave para la formación de vesículas intraluminares y vesículas de tipo exosomas.</i> .....	78
4.2.2.1.4 <i>Alteraciones en la expresión o función de GIVps4a produce acumulación de vesículas intraluminares en las vacuolas periféricas.</i> .....	82
4.2.2.1.5 <i>Cambios en la expresión y función de GIVps4a altera la electronegatividad de las vacuolas periféricas.</i> .....	83
4.2.2.2 <i>GI Rab11 regula la formación de vesículas intraluminares y vesículas de tipo exosomas</i> .....	84
4.2.2.2.1 <i>GI Rab11p-HA está presente en retículo endoplásmico y vacuolas periféricas</i> ....	84
4.2.2.2.2 <i>La disminución de la expresión de GI Rab11 provoca una inhibición en la producción de vesículas tipo exosomas.</i> .....	85
4.2.2.2.3 <i>Cambios en la expresión de GI Rab11p produce alteraciones en la producción de vesículas intraluminares en las vacuolas periféricas.</i> .....	87
4.2.3 <i>Discusión</i> .....	88
5. CONCLUSIONES FINALES .....	94
ANEXO I.....	97
6. BIBLIOGRAFÍA .....	148

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis dieron origen a:

### Publicaciones en revistas internacionales

**Moyano S**; Musso J; Camerini S; Casella M; Lalle M and Touz MC. Extracellular vesicles of pathogenically different *Giardia* strains reveal differential proteomic content. En preparación

**Moyano S**; Musso J; Feliziani C; Zamponi N; Frontera L; Ropolo A; Lanfredi-Rangel A; Lalle M and Touz MC. Exosome biogenesis in the protozoa parasite *Giardia lamblia*: A Model of reduced interorganellar crosstalk. *Cells*. **2019. Dec 9;8(12). pii: E1600. doi: 10.3390/cells8121600.**

Frontera L; **Moyano S**; Quasollo G; Lanfredi-Rangel A; Ropolo A and Touz MC. Lactoferrin and Lactoferricin endocytosis halt *Giardia* cell growth and prevent infective cyst production. *Scientific reports*. **2018. Dec 21;8(1):18020. doi: 10.1038/s41598-018-36563-1.**

Feliziani C; Valdez-Taubas J; **Moyano S**; Quasollo G; Poprawski J; Wendland B and Touz MC. Vestiges of ent3p/ent5p function in the giardial epsin homolog. *Biochimica et biophysica acta-molecular cell research*. **2016. Apr;1863(4):749-59. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.02.001.**

### Presentaciones a congresos

**Moyano S**; Musso J; Lanfredi-Rangel y Touz MC. “Mecanismos involucrados en la formación de exomasas en *G. lamblia*”. XXII Sociedad de Biología de Córdoba. Córdoba, Argentina. **2019**

**Moyano S**; Musso J; Lanfredi-Rangel A and Touz MC. “Extracellular vesicles of pathogenically different *Giardia* strains reveal differential proteomic content”. LV annual SAIB meeting and XIV PABMB congress. Salta, Argentina. **2019**

**Moyano S**; Lalle M y Touz MC. “Aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares del parasite *Giardia lamblia*”. XXI Jornadas Sociedad de Biología de Córdoba. La Falda, Córdoba. Argentina. **2017**

**Moyano S**; Lalle M and Touz MC. “Forming exosomes without all founding players”. LI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. SAIB. Córdoba, Argentina. **2016**

Touz MC; Valdez-Taubas J; **Moyano S**; Wendland B and Feliziani C. "The unique dual function and the evolutionary relationship of the giardial epsin-like protein". EMBO WORKSHOP Actualizations in Membrane Trafficking in Health and Disease. La Serena, Chile. **2016**

## Abreviaturas

(TYI-S-33/-sbb)	medio completo de crecimiento carente de suero adulto bovino y bilis bovina
AcPh	enzima fosfatasa ácida (del inglés <i>Acid Phosphatase</i> )
ADI	arginina deiminasa
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia del ARN
ARN	ácido ribonucleico
ARNdc	ácido ribonucleico doble cadena
ARNi	ácido ribonucleico de interferencia
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATP	adenosina trifosfato
BMP	bis fosfato de monoacilglicerol (del inglés <i>Bis Monoacylglycerol Phosphate</i> )
BSA	suero adulto bovino
Ca <sup>+2</sup>	iones de calcio
CD	grupo de diferenciación (del inglés <i>Cluster of Differentiation</i> )
CT	número de ciclo de la PCR en el cual la cantidad de producto amplificado cruza el umbral establecido (del inglés <i>Cycle Threshold</i> )
C-terminal	carboxilo-terminal
DAPI	marcador fluorescente de núcleo (del inglés <i>4',6-Diamidino-2-PhenylIndole</i> )
DE	desvío estándar
DLS	dispersión dinámica de la luz (del inglés <i>Dinamic Light Scatter</i> )
DMSO	dimetilsulfóxido
DTT	ditiotreitól
E	ácido glutámico
EDTA	ácido etilendiaminotetraácido
EF1	factor de elongación 1
ENTH	dominio ENTH (del inglés <i>Epsin N-Terminal Homology</i> )
ESCRT	complejo endosomal de clasificación requerido para el transporte (del inglés <i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i> )
FPR	tasa de falsos positivos (del inglés <i>False Positive Rate</i> )
GDB	base de datos del genoma de <i>Giardia</i> (del inglés <i>Giardia Database</i> )
HA	epitope de hemaglutinina
HRP	peroxidasa de rábano (del inglés <i>Horseradish Peroxidase</i> )
HSP70, 90	proteína de choque térmico 70, 90 (del inglés <i>Heat Shock Protein</i> )
IEC	células epiteliales intestinales (del inglés <i>Intestinal Epithelial Cells</i> )
IF	inmunofluorescencia
ILVs	vesículas intraluminales (del inglés <i>Intraluminal Vesicles</i> )
kDa	kilodalton
LB	medio de cultivo para bacterias Luria-Bertoni
LF	lactoferrina
LRP	receptor de lipoproteínas, relacionados a receptores de LDL (del inglés <i>Lipoprotein Receptor-related Protein</i> )
MET	microscopía electrónica de transmisión
miARN	micro ácido ribonucleico
MIM	motivo de interacción (del inglés <i>Interacting Motif</i> )

MIT	interacción y tráfico de microtúbulos (del inglés <i>Microtubule Interacting and Trafficking</i> )
MVBs	cuerpos multivesiculares (del inglés <i>Multivesicular Bodies</i> )
MVs	microvesículas
NSAF	factor de abundancia espectral normalizada (del inglés <i>Normalized Spectral Abundance Factor</i> )
N-terminal	amino terminal
OCT	ornitil carbamil transferasa
ORF	marco abierto de lectura (del inglés <i>Open Reading Frame</i> )
Pb	pares de bases
PBS	solución amortiguadora de fosfato salino (del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PBSm	PBS + medio de crecimiento al 1%
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PDI <sub>2</sub>	proteína disulfuroisomerasa 2
PI3P	fosfatidil inositol 3 trifosfato (del inglés <i>Phosphatidylinositol 3-trisPhosphate</i> )
PVs	vacuolas periféricas (del inglés <i>Peripheral Vacuoles</i> )
Q	glutamina
RT-PCR	transcripción reversa del ARN seguida de reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>RetroTranscription-PCR</i> )
SDS	dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida conteniendo dodecil sulfato sódico (del inglés <i>Sodium Dodecyl Sulfate- Poly Acrylamide Gel Electrophoresis</i> ).
SMasas	esfingomielinasas
SNARE	receptor de proteína de unión al factor sensible a N-etilmaleimida
SNR	relación señal/ruido (del inglés <i>Signal-to-Noise Ratio</i> )
TBS	solución amortiguadora de Tris-salino (del inglés <i>Tris Buffered Saline</i> )
Tet	tetraciclina
tExo	vesículas similares a exosomas
tMVs	vesículas similares a microvesículas
TNF- $\alpha$	factor de necrosis tumoral alfa
Trtx	enzima citosólica tiorredoxina reductasa
VCC	vesículas recubiertas de clatrina
VEs	vesículas extracelulares
VPS	proteína vacuolar de superficie (del inglés <i>Vacuolar Protein Sorting</i> )
VSPs	proteínas variables de superficie (del inglés <i>Variant Specific-Proteins</i> )

## Resumen

*Giardia lamblia* es un parásito protozoario que coloniza el epitelio intestinal de humanos y otros vertebrados. Las infecciones varían de agudas a crónicas, dependiendo de la susceptibilidad del hospedador y la cepa del parásito. En este trabajo de tesis, mostramos que los subtipos genéticos (ensamblajes) A y B de *Giardia lamblia* que infectan humanos poseen la capacidad de formar y liberar al medio extracelular vesículas de diferentes tamaños. Además, hemos realizado el primer análisis proteómico de las vesículas extracelulares de ambos ensamblajes y encontramos que, tanto las vesículas de tipo microvesículas como las de tipo exosomas, podrían estar seleccionando el contenido de proteínas conservadas y específicas de *G. lamblia*. Por otra parte, realizamos una combinación de metodologías que nos permitieron demostrar que *G. lamblia* secreta al medio extracelular vesículas que son notablemente similares a exosomas de otros tipos celulares en términos de tamaño, forma, densidad y presencia de proteínas típicas. Los resultados obtenidos también mostraron que, a pesar de la falta de cuerpos multivesiculares típicos presentes en el parásito, se pueden formar vesículas de tipo exosomas (tExo) en las vacuolas periféricas (PVs) endo-lisosomales de *G. lamblia*. Además, análisis ultraestructurales y determinación de la cantidad de tExo liberados mostraron que la actividad ATPasa de la proteína ESCRT Vps4a de *G. lamblia* y la presencia de la pequeña GTPasa Rab11, son esenciales para la formación de vesículas intraluminares en la PVs y, en consecuencia, para la obtención de tExo en el medio extracelular. También, observamos que la alteración en la función de GIVps4a genera una acumulación inusual de material electrodensito en las PVs, lo que indica que GIVps4p podría estar implicada en el mantenimiento del contenido de estas vacuolas. Los resultados observados, en su conjunto, sugieren que este parásito es capaz de producir diferentes tipos de vesículas extracelulares mediante mecanismos conservados, aunque con características únicas.

**Abstract**

*Giardia lamblia* is a protozoan parasite that colonizes the intestinal epithelium of humans and other vertebrates. Infections vary from acute to chronic, depending on the susceptibility of the host and the strain of the parasite. In this thesis, we show that the genetic subtypes A and B of *G. lamblia* that infect humans have the ability to form and release vesicles of different sizes to the extracellular environment. In addition, we have performed the first proteomic analysis of the extracellular vesicles of both assemblies, and found that the microvesicle and the exosome type vesicles could select conserved and specific *Giardia* proteins. On the other hand, we performed a combination of methodologies that allowed us to demonstrate that *G. lamblia* secretes vesicles that are remarkably similar to exosomes from other cell types in terms of size, shape, density, and presence of marker proteins. The results obtained also showed that, despite the lack of typical multivesicular bodies in the parasite, exosome-like vesicles (tExo) can be formed in the endo-lysosomal peripheral vacuoles (PVs) in *G. lamblia*. In addition, ultrastructural analysis and determination of the amount of tExo released showed that the ATPase activity of the ESCRT Vps4a protein of *G. lamblia* and the presence of the small GTPase Rab11 are essential for the formation of intraluminal vesicles in the PVs and; therefore, for the recovery of tExo from the extracellular medium. Also, we observe that the alteration in the function of GIVps4a generates an unusual accumulation of electron-dense material in the PVs, indicating that GIVps4p could be involved in the maintenance of the molecular composition of these vacuoles. The observed results, as a whole, suggest that this parasite is capable of producing different types of extracellular vesicles by conserved mechanisms, although with unique characteristics.

# Introducción general

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Una característica que define a las células es la capacidad de comunicarse entre sí. Con este objetivo, las células han desarrollado diferentes mecanismos que incluyen contacto directo célula-célula o la transferencia de moléculas secretadas. Sin embargo, hace no más de tres décadas, se describió un tercer mecanismo de comunicación intercelular que involucra la liberación de vesículas extracelulares o VEs (del inglés *Extracellular Vesicles*), las cuáles son portadoras de moléculas biológicamente activas que pueden realizar funciones biológicas definidas (Raposo and Stoorvogel, 2013). En este sentido, se conoce que las VEs están rodeadas de una doble capa de fosfolípidos y que la mayoría de las células, incluyendo los dominios Bacteria, Archaea y Eukarya, poseen la capacidad de liberar al medio extracelular diferentes tipos de VEs (van der Pol et al., 2012). En la actualidad, las VEs adquieren cada día más importancia debido a las funciones especializadas que realizan y a sus posibles aplicaciones clínicas (Jaiswal and Sedger, 2019; van der Pol et al., 2012; Willms et al., 2018).

En este trabajo de tesis, se demuestra por primera vez la producción y caracterización de VEs por parte de los ensamblajes de *Giardia lamblia* que infectan humanos y, específicamente, se muestran los mecanismos involucrados en la formación y/o liberación de vesículas de tipo exosomas (tExo).

### 1.1 HISTORIA DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

El descubrimiento de las vesículas derivadas de células se remonta a 1940, con estudios que evidenciaron la importancia biológica de la proteína tromboplastina de la sangre (Chargaff and West, 1946). En ese momento, los tiempos de coagulación se realizaban mediante centrifugaciones a diferentes velocidades y se observó que la centrifugación a alta velocidad extendía significativamente el tiempo de coagulación del sobrenadante (van der Pol et al., 2012). Además, cuando se le adicionaba al precipitado de la centrifugación el factor de coagulación del plasma, los tiempos de coagulación se acortaban, lo que hizo sospechar que el plasma libre de células contenía un factor subcelular capaz de promover la coagulación de la sangre (Bendich and Chargaff, 1946).

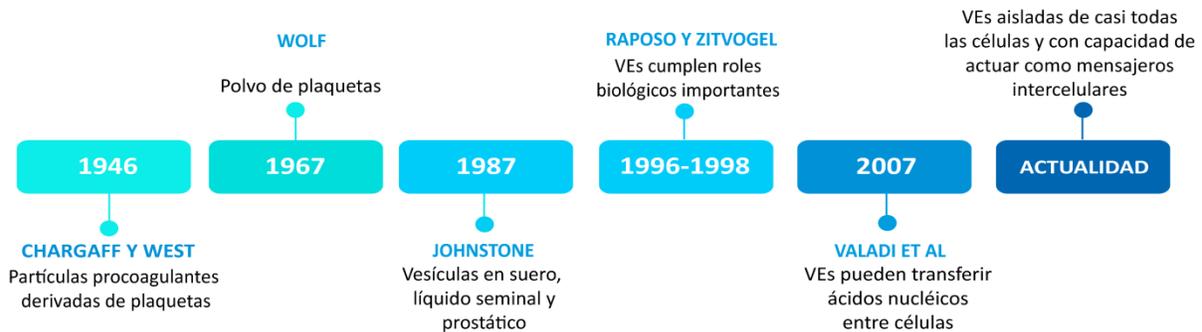
Más de 20 años después, en 1967, se identificó ese “factor subcelular” por microscopía electrónica y se observó que consistía en pequeñas vesículas originadas a partir de las plaquetas, con un diámetro comprendido entre 20-50 nm y una densidad de 1.020 a 1.025 g/ml, a las que denominaron como “polvo plaquetario” (Wolf, 1967).

Posteriormente, en el año 1975 se demostró que el suero fetal de ternera contenía “numerosas vesículas” con un diámetro de 30-60 nm (Dalton, 1975). Al mismo tiempo, en otro estudio se aislaron vesículas a partir del medio condicionado de reticulocitos de oveja, a las cuales se las denominó “exosomas” y se caracterizaban por tener aspectos en común con la membrana plasmática, como la presencia del receptor de transferrina, lo que llevó a concluir que la secreción de vesículas podía ser un mecanismo para secretar y exportar proteínas específicas de la membrana plasmática (Johnstone et al., 1987).

Al principio, la hipótesis inicial era que las VEs transportaban desechos celulares y servían para eliminar proteínas que la célula no necesitaba y así mantener la homeostasis celular; sin embargo, diez años más tarde, Raposo et al. mostraron la primera evidencia de que las VEs presentaban otras funciones biológicas importantes, demostrando que las vesículas derivadas de linfocitos B pueden inducir una respuesta inmune (Raposo et al., 1996). Poco después, Zitvogel et al., revelaron que los exosomas secretados por las células presentadoras de antígeno, contenían proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad I y II, y moléculas coestimuladoras para linfocitos T. Además, estos exosomas al ser inoculados en ratones eran capaces de eliminar o detener el crecimiento de tumores a través de una respuesta de linfocitos T (Zitvogel et al., 1998).

Desde entonces, el interés en el estudio de los exosomas ha ido en aumento y la producción de los mismos se ha descrito en muchos tipos celulares como células epiteliales (van Niel et al., 2001), células neuronales (Yuyama et al., 2015), keratinocitos (Lo Cicero et al., 2015), fibroblastos (Luga and Wrana, 2013) y células tumorales, entre otras (Tkach and They, 2016). Un avance importante para comprender la función de los exosomas se inició con la observación de que los mismos son portadores de proteínas, lípidos, ARNm y miARNs y que representan una forma de comunicación intercelular mediante la transferencia de dichas moléculas a una célula receptora (Ratajczak et al., 2006; Valadi et al., 2007).

En las últimas décadas, se realizaron grandes avances en la biogénesis, contenido y funciones biológicas de las VEs. La **Figura 1.1** destaca los descubrimientos y eventos más importantes en el área de las mismas.



**Figura 1.1.** Descubrimientos más importantes en el área de las VEs detallando el año y autores.

## 1.2 CLASIFICACIÓN DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

Las VEs están rodeadas por una bicapa lipídica, poseen un tamaño que varía entre 30-2000 nm y los principales componentes incluyen proteínas, lípidos y ácidos nucleicos procedentes de la célula que le dio origen (Upadhya and Shetty, 2019). Actualmente, la clasificación de las VEs se basa en las características que posee cada grupo con respecto a su tamaño, densidad y biogénesis, existiendo tres clases principales: exosomas, microvesículas (MVs) y cuerpos apoptóticos (**Tabla 1.1**). El tipo de VE más estudiado han sido los exosomas, que se forman a través del sistema endosomal, poseen un tamaño aproximado de 40-120 nm y una densidad característica de 1,13-1,19 g/cm<sup>3</sup>. Respecto a las MVs, se describió que las mismas poseen tamaños más heterogéneos que oscilan entre 50-1000 nm y se forman a partir de la evaginación de la membrana citoplasmática. Similar a las MVs, los cuerpos apoptóticos se originan directamente de la membrana citoplasmática, son de mayor tamaño midiendo entre 500-2000 nm, con una densidad de 1,36 g/cm<sup>3</sup> y se liberan de la célula como consecuencia del mecanismo de muerte celular programada (They et al., 2018).

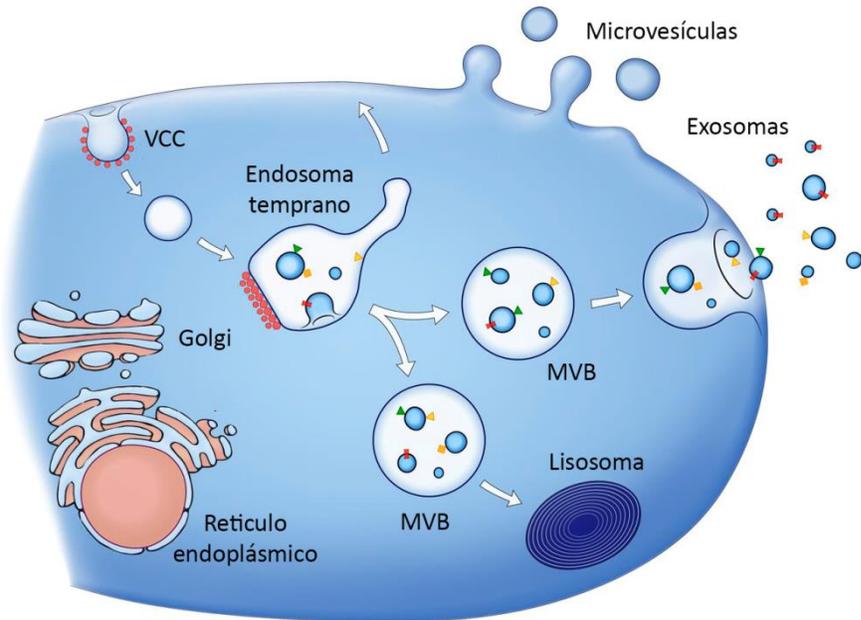
Características	Exosomas	Microvesículas	Cuerpos apoptóticos
Tamaño	40-120 nm	50-1000 nm	500-2000 nm
Densidad	1,13-1,19 g/cm <sup>3</sup>	No determinado	1,36 g/cm <sup>3</sup>
Biogénesis	Compartimientos endosomales/Cuerpos multivesiculares	Membrana plasmática	Fragmentos de células muertas

**Tabla 1.1. Principales características de los diferentes tipos de vesículas extracelulares.**

### 1.3 BIOGENESIS DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

Como mencionamos anteriormente, una de las diferencias para clasificar las VEs se basa en su mecanismo de formación. En la **Figura 1.2** se muestra un esquema general de la biogénesis de los principales tipos de VEs, donde se observa que los exosomas se forman a partir de la vía endocítica, la invaginación de la membrana endosómica forma cuerpos multivesiculares o MVBs (del inglés *Multivesicular Bodies*), que pueden fusionarse con la membrana plasmática para liberar los exosomas al medio extracelular y que se describirán con más detalle en las próximas secciones.

Por otro lado, la biogénesis de las MVs es menos conocida si se la compara con la gran cantidad de bibliografía disponible sobre la formación de exosomas. Se ha observado, que las MVs no se originan por la vía endocítica sino que se forman mediante la evaginación de la membrana plasmática, resultando en un mecanismo que depende de la concentración intracelular de Ca<sup>+2</sup> y que, además, su formación requiere de una combinación de mecanismos que incluyen el reordenamiento de fosfolípidos de la membrana y la activación de proteínas del citoesqueleto (Bever et al., 1999; Leventis and Grinstein, 2010). De hecho, la formación de las MVs es una propiedad innata de muchos tipos celulares y ocurre en respuesta a la activación de diferentes procesos celulares (Hugel et al., 2005; Nolan et al., 2008).



**Figura 1.2. Esquema sobre la biogénesis y liberación de microvesículas y exosomas.** Las microvesículas geman directamente de la membrana plasmática, mientras que los exosomas se generan como vesículas intraluminarias dentro de los MVBs. Existen dos tipos de MVBs, aquellos que se fusionan con la membrana plasmática y liberan al medio extracelular los exosomas y otros MVBs que se fusionan con lisosomas. Las líneas rojas simbolizan clatrina asociada con vesículas en la membrana plasmática (vesículas recubiertas de clatrina [VCC]). Las proteínas transmembrana y asociadas a la membrana en las vesículas se representan como triángulos y rectángulos, respectivamente. Las flechas representan las direcciones propuestas para el transporte de proteínas y lípidos entre los orgánulos y entre los MVBs y la membrana plasmática para la secreción de exosomas (Raposo and Stoorvogel, 2013).

### 1.3.1 Formación de exosomas

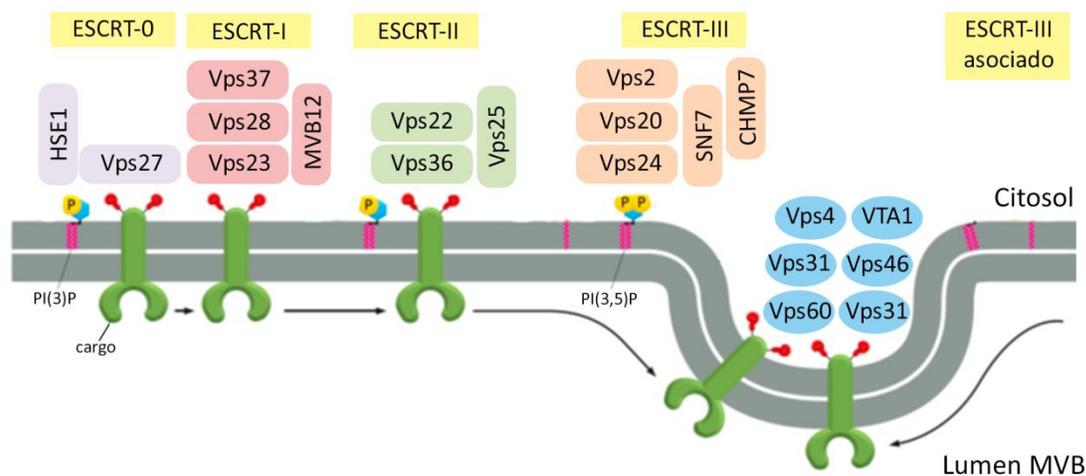
En células eucariotas, el sistema endocítico celular está formado por un conjunto de compartimentos membranosos muy dinámicos que se encargan de gestionar los receptores y sus ligandos de membrana, reciclarlos y degradarlos (Klumperman and Raposo, 2014; van der Vlist et al., 2012). Durante este proceso, en el interior del endosoma, se acumulan vesículas formadas por invaginación de su membrana denominadas vesículas intraluminales o ILVs (del inglés *Intraluminal Vesicles*). El endosoma que contiene las ILVs se denomina MVB. Los MVBs pueden finalmente ir a degradación mediante la fusión con los lisosomas o pueden liberar su contenido al espacio extracelular tras su fusión con la membrana plasmática, dando lugar a los exosomas (Hurley et al., 2010; Hurley and Hanson, 2010; Raiborg and Stenmark, 2009; Slagsvold et al., 2006). A diferencia de los MVBs destinados a la degradación en lisosoma, aquellos cuyo destino será fusionarse a la membrana plasmática presentan una composición lipídica diferente, enriquecida en colesterol.

Los mecanismos implicados en la biogénesis de exosomas pueden variar dependiendo del tipo celular y de las condiciones en las que se encuentre la célula (Thery, 2011). Se han descrito dos vías principales de formación de las ILVs: un mecanismo dependiente y otro independiente de ESCRT (del inglés *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*).

### 1.3.1.1 Mecanismo dependiente de ESCRT

El mecanismo más conocido en la formación de vesículas está dirigido por el complejo ESCRT. Dicho complejo está compuesto por alrededor 30 proteínas diferentes, altamente conservadas, que se ensamblan en 4 complejos (ESCRT -0, -I, -II y -III) (**Figura 1.3**). El reclutamiento de estos complejos se produce secuencialmente sobre la cara citoplasmática de la membrana de los MVBs.

Esta maquinaria consta de tres funciones distintas pero cooperativas. En primer lugar, el complejo ESCRT-0 reconoce proteínas ubiquitinadas en la membrana del endosoma. Secuencialmente, el complejo ESCRT-I y II promueven la deformación de la membrana hacia el interior del endosoma para formar las ILVs. Por último, el complejo ESCRT-III participa en la escisión final de la membrana para formar las ILVs (Nickerson et al., 2007). Durante estos procesos, se requieren proteínas accesorias tales como la AAA ATPasa Vps4 (del inglés *Vacuolar Protein Sorting 4*), la cual es clave para el desacople final de las proteínas y la abscisión de la membrana, siendo indispensable para la biogénesis de los MVBs (Babst et al., 2011) (**Figura 1.3**).



**Figura 1.3. Esquema de la estructura de la maquinaria ESCRT.** Ensamblaje secuencial de los componentes ESCRT-0, I, II y III en la membrana de un MVB para la formación de las ILVs.

### 1.3.1.2 Mecanismos independientes de ESCRT

Diferentes estudios han demostrado que las células de mamíferos mantienen la capacidad de formar ILVs en ausencia de componentes claves de la maquinaria ESCRT, lo que indica la existencia de otros mecanismos que participan en la formación de ILVs que son independientes del complejo ESCRT (Colombo et al., 2013; Stuffers et al., 2009). Entre estos mecanismos se destacan, en primer lugar un mecanismo que involucra a las proteínas tetraspaninas, componentes de las membranas de los exosomas y, por otro lado, un mecanismo que involucra diferentes tipos de lípidos.

#### 1.3.1.2.1 Mecanismo independiente de ESCRT que involucra a las tetraspaninas

Las tetraspaninas son una familia de proteínas integrales de membrana altamente enriquecidas en los exosomas (Escola et al., 1998). Dichas proteínas son capaces de modular la formación de microdominios de membranas y juegan un papel fundamental no solo en la formación de las ILVs, sino también en la selección de proteínas que específicamente se incorporan dentro de ellas (Perez-Hernandez et al., 2013; van Niel et al., 2011). Entre los miembros de esta familia se destacan las proteínas CD9, CD63, CD37, CD81 y CD82, las cuales son consideradas marcadores específicos de exosomas (Andreu and Yanez-Mo, 2014).

#### 1.3.1.2.2 Mecanismo independiente de ESCRT que involucra lípidos

En función de su estructura, los lípidos proporcionan a las bicapas lipídicas las características estructurales y biofísicas que condicionan su forma y/o curvatura (McMahon and Boucrot, 2015). Estudios recientes muestran su importancia como elementos reguladores en la formación y composición de los exosomas (Record et al., 2014; Subra et al., 2007). El BMP (del inglés *Bis Monoacylglycerol Phosphate*), es un lípido cuya presencia está restringida a los endosomas tardíos (Subra et al., 2007). Se ha observado que el BMP puede jugar un papel importante en la deformación de la membrana durante la formación de las ILVs (Matsuo et al., 2004) y que este proceso puede estar regulado a través de la proteína Alix (Odorizzi, 2006). Dentro de los lípidos que se encuentran altamente enriquecidos en la composición de los exosomas está la ceramida. Si bien es sintetizada *de novo* en el retículo endoplásmico, su principal fuente proviene de la hidrólisis de esfingomielina por la acción de las esfingomielinasas (SMasas) (Clarke et al., 2006; Clarke et al., 2007). La inhibición farmacológica de las SMasas neutrales 1 y 2 se ha visto que reduce significativamente la

biogénesis de exosomas (Llorente et al., 2013; Trajkovic et al., 2008). Por otro lado, la esfingomielina, los glicosfingolípidos y el colesterol también aparecen en niveles relativamente altos en exosomas (Skotland et al., 2017). Esta composición lipídica es típica de los microdominios de membrana plasmática resistentes a detergentes (Ikonen, 2001; Simons and Sampaio, 2011), sugiriendo que éstos pueden también encontrarse a nivel de los MVBs y que poseen un papel importante en la organización de las membranas implicadas en la formación de las ILVs (de Gassart et al., 2003).

La variedad de mecanismos descritos en la biogénesis de los exosomas permite diferenciar subpoblaciones de exosomas, heterogéneos tanto en su composición como en su distribución y función (Willms et al., 2016; Zhang et al., 2018). Sin embargo, nuevos estudios serán necesarios para poder entender si mecanismos dependientes e independientes de ESCRT actúan de forma completamente autónoma o, por el contrario, sinérgicamente en diferentes condiciones fisiológicas y/o patológicas (Zhang et al., 2018).

#### **1.4 MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA LIBERACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES**

Las maquinarias implicadas en la movilización de MVBs a la periferia celular y su acoplamiento y fusión con la superficie celular se encuentran aún en una etapa temprana de comprensión. En general, estos procesos requieren del citoesqueleto (actina y microtúbulos), de motores moleculares asociados (kinesinas y miosinas), de interruptores moleculares (pequeñas GTPasas) y de la maquinaria de fusión del receptor de la proteína de unión al factor sensible a N-etilmaleimida (SNARE) y factores de anclaje, entre otros (Cai et al., 2007).

##### **1.4.1 Liberación de exosomas**

Una vez formados, los MVBs deben dirigirse hacia la periferia celular y fusionarse con la membrana plasmática para liberar su contenido y secretar los exosomas. Existe un grupo de proteínas de la familia Rab que poseen un rol importante en la regulación de la vía secretora de las vesículas, siendo además reguladores esenciales del transporte intercelular de vesículas entre diferentes compartimientos y en la fusión de las vesículas con la membrana plasmática. La familia Rab está compuesta por más de 60 GTPasas, cada una de las cuáles está asociada preferentemente con un compartimiento intracelular (Savina et al., 2002).

Un estudio realizado en la línea celular de leucémica K562 ha demostrado que Rab11 es necesaria para la liberación de exosomas (Savina et al., 2002). Además, Ostrowski et al,

realizaron silenciamiento de genes de 59 miembros de la familia Rab GTPasas, en células HeLa, y observaron que solo los silenciamientos de los genes que codifican para Rab27a y Rab27b producían una disminución significativa de la secreción de exosomas (Ostrowski et al., 2010). Ambos trabajos mostraron que Rab11 y Rab27 tienen un rol fundamental en la secreción de las vesículas al medio extracelular.

### **1.5 COMPOSICIÓN MOLECULAR DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES**

Durante su biogénesis, las VEs pueden capturar selectivamente proteínas específicas de cada célula, lípidos, ARN o incluso ADN, que pueden convertirse en parte de la "firma molecular" de la membrana o carga de la VE (Skotland et al., 2017). En base a estas firmas discriminatorias, las VEs aisladas de mezclas complejas (por ejemplo sangre u orina), pueden rastrearse hasta sus células de origen. Sin embargo, el mecanismo de tal empaque selectivo sigue siendo desconocido. Diferentes moléculas se pueden incorporar de forma concomitante en las diferentes VEs. En general, los sistemas de comunicación biológica se caracterizan por redundancias e interdependencia, de modo que una variable está asociada con otras variables. Surge entonces la pregunta: ¿Existen moléculas ("marcadores") que sean específicas de una ruta de biogénesis particular y que nos permitan distinguir diferentes VEs? Análisis detallados de las moléculas de membrana y de la carga pueden ayudar a avanzar en las distinciones particulares de las VEs.

A lo largo de los últimos años se han realizado un gran número de estudios para evaluar el contenido de exosomas en diferentes tipos celulares y fluidos corporales. Los resultados de estos estudios se agrupan en una base de datos de libre acceso denominada "ExoCarta" ([www.exocarta.org](http://www.exocarta.org)) (Mathivanan et al., 2012). ExoCarta se incorporó recientemente a una base de datos más completa denominada Vesiclepedia, que incluye además estudios realizados en otros tipos de VEs ([www.microvesicles.org](http://www.microvesicles.org)) (Kalra et al., 2012). La información de estas bases de datos se actualiza continuamente con la ayuda de la comunidad científica que estudia VEs. Ambas bases de datos incluyen datos no solo sobre proteínas sino también de ácidos nucleicos y lípidos, y de los procedimientos de purificación realizados. Su continua actualización los convierte en una herramienta crucial para mejorar el estudio de estas vesículas (Colombo et al., 2014).

### 1.5.1 Proteínas presentes en los exosomas

El contenido total de proteínas de las VEs se ha estudiado ampliamente desde su descripción inicial. Las técnicas que permitían la detección de proteínas específicas basadas en anticuerpos como inmunotransferencia e inmuno-microscopía electrónica, se utilizaron en los primeros estudios sobre exosomas; pero el desarrollo de técnicas de análisis proteómico, como la espectrometría de masa, en la década de 1990, permitió la identificación a gran escala de proteínas que no habían sido descritas anteriormente como componentes de las VEs. Estos estudios se han llevado a cabo en exosomas de cultivos celulares y en aquellos procedentes de cultivos biológicos tan diversos como orina, plasma, leche materna y líquido amniótico (Colombo et al., 2014).

Estudios de proteómica mostraron que los exosomas contienen un subconjunto específico de proteínas celulares, algunas de las cuales dependen del tipo celular que las secreta mientras que otras se encuentran presentes en la mayoría de los exosomas independientemente del tipo celular. Así, los exosomas contienen proteínas típicas de los endosomas, la membrana plasmática y el citosol, mientras que las proteínas presentes en el núcleo, las mitocondrias, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi están ausentes en su mayoría. Estas observaciones resaltan la especificidad de la formación de estas vesículas y muestran que representan un compartimiento subcelular específico y no un área aleatoria.

Típicamente, los exosomas están enriquecidos en proteínas con diversas funciones, tales como:

- Proteínas que participan en la penetración celular, invasión y en eventos de fusión como las tetraspaninas (CD9, CD63, CD81, CD82).
- Proteínas de choque térmico (HSP70, HSP90) como parte de la respuesta al estrés.
- Proteínas que están involucradas en la formación de los MVBs tales como Alix, TSG101 y diferentes VPS.
- Proteínas del citoesqueleto incluyendo actina, tubulina, miosina y vimentina.
- Proteínas de síntesis y proteínas relacionadas con la transcripción (proteínas ribosomales, ubiquitinas, histonas, factor del complemento 3).
- Enzimas metabólicas (gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa, fosfoglicerato kinasa, piruvato kinasa, ATPasa, glucosa-6-fosfato isomerasa).

- Proteínas de transporte y relacionadas con eventos de fusión de membrana (anexinas, dinaminas, syntaxina-3, proteína relacionada-Ras 5,7).
- Proteínas de señalización como proteína 14-3-3 y GTPasas.

Muchas de estas proteínas se repiten en los proteomas de exosomas de diferentes especies y están presentes de manera específica, por lo que se lo definen como **“MARCADORES DE EXOSOMAS”**.

#### 1.5.2 Lípidos presentes en los exosomas

Respecto a la composición de lípidos presentes en los exosomas, ésta varía según la célula que le dio origen (Yanez-Mo et al., 2015), aunque existen lípidos que se encuentran conservados y que están presentes en la mayoría de las VEs (Staubach et al., 2009). Previamente, ha sido descrito que los principales lípidos que se encuentran presentes son colesterol, diglicéridos, esfingolípidos (esfingomiolina y ceramidas), fosfolípidos, glicerofosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol) y poliglicerofosfolípidos (Colombo et al., 2014). Además, los exosomas también contienen lípidos bioactivos, como prostaglandinas y leucotrienos, que forman parte de la información transferida y participan en vías de señalización (Colombo et al., 2014; Raposo and Stoorvogel, 2013; Skotland et al., 2017; Vlassov et al., 2012).

Los lípidos aportan a los exosomas resistencia y estabilidad y además participan en el reconocimiento e internalización por parte de la célula diana.

#### 1.5.3 Ácidos nucleicos presentes en los exosomas

Además de proteínas y lípidos, los exosomas contienen ácidos nucleicos como ADN y ARN que pueden ser incorporados en las células receptoras y así modificar el fenotipo de las mismas.

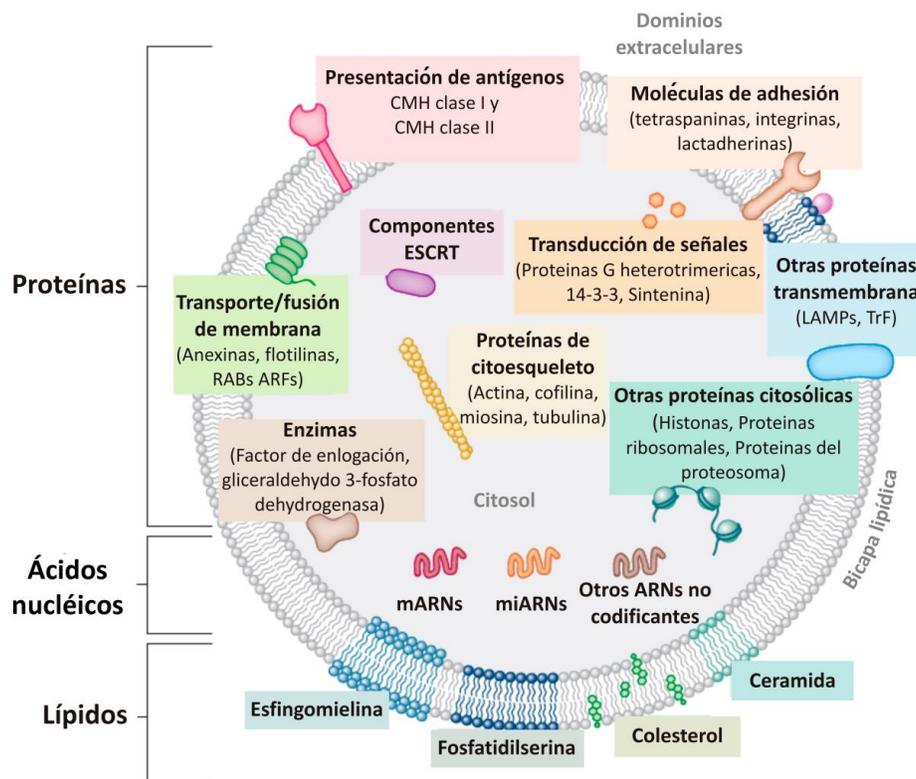
Después de la primera descripción de ácidos nucleicos en exosomas secretados por mastocitos (Valadi et al., 2007), numerosos grupos han analizado la presencia de material genético en los exosomas y mostraron que los mismos son portadores de ARN codificantes (Peake et al., 2014) y no codificantes (Berrondo et al., 2016; Qu et al., 2016). Los ácidos nucleicos más abundantes presentes en exosomas corresponden a moléculas de ARN tales como miARN o ARNm (Janas et al., 2015; Villarroja-Beltri et al., 2013a; Zhang et al., 2015). Por otra parte, se encuentran presentes niveles menores de ARN ribosómico y de transferencia, y

se ha observado la presencia de moléculas de ADN mono y bicatenario y ADN mitocondrial (Thakur et al., 2014).

Además de los ácidos nucleicos, existen una gran variedad de ribonucleoproteínas que están presentes y que poseen un papel fundamental en el transporte y almacenamiento de este material genético en forma de complejos moleculares (Statello et al., 2018).

A pesar de que no se conoce con exactitud el mecanismo por el cual el material genético y moléculas de ARN son almacenados en los exosomas, varios estudios han revelado que dichas vesículas contienen en su interior proteínas que tienen motivos específicos para unirse a ARN, y que estas proteínas pueden inducir la incorporación de diferentes tipos de ARN dentro de los exosomas (Kossinova et al., 2017; Santangelo et al., 2016; Shurtleff et al., 2016; Villarroja-Beltri et al., 2013b).

En la **Figura 1.4** se representa la composición básica general de los exosomas de mamíferos, incluyendo proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.



**Figura 1.4. Composición molecular de los exosomas.** Representación esquemática de los componentes de los exosomas (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos), localización y orientación en la bicapa lipídica. Adaptado de (Colombo et al., 2014).

## 1.6 FUNCIONES GENERALES DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

Las vesículas secretadas son entidades biológicamente activas capaces de actuar como mensajeros intercelulares (Johnstone et al., 1987). Desde su descubrimiento, muchas investigaciones se han centrado en estudiar las funciones que poseen.

Existen una variedad de trabajos en los cuáles se ha descrito diferentes funciones que poseen las VEs; por ejemplo, se ha observado que las VEs liberadas por células afectan el proceso inflamatorio al transferir receptores de transporte y mediadores inflamatorios como la interleuquina 1 (Kim et al., 2006; MacKenzie et al., 2001; van der Pol et al., 2012). Otra función importante que se ha observado en las VEs es la capacidad de transferir información genética en procariontes (Yaron et al., 2000) y eucariotes (van der Pol et al., 2012), ya que los exosomas son portadores de miARN y ARNm, los cuales son capaces de modificar el fenotipo de las células receptoras (Valadi et al., 2007). Por otro lado, pueden transferir la actividad metastásica de células tumorales a líneas celulares poco metastásicas *in vitro*, debido a una transferencia de antígenos funcionales (van der Pol et al., 2012). También, se ha descrito que están relacionados con la secreción alternativa de proteínas y la presentación de antígenos (van der Pol et al., 2012). Otras de las características más importantes es que las VEs pueden ser consideradas como candidatos a vacunas y biomarcadores para enfermedades renales (Pisitkun et al., 2006) y diferentes tipos de cáncer (van der Pol et al., 2012). Además de todas las funciones descritas anteriormente, ha sido comprobada la participación de las VEs en la transferencia de morfógenos (molécula de naturaleza orgánica producida y secretada por células embrionarias que pueden actuar a distancia sobre otras células) y de priones (agentes infecciosos compuestos por proteínas capaces de generar múltiples trastornos degenerativos) (Faure et al., 2006), así como su rol en la adhesión celular (Clayton et al., 2004), en el proceso de coagulación (Wolf, 1967) y en la protección contra el estrés intracelular y extracelular (Sims et al., 1988).

## 1.7 LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES EN ENFERMEDADES PARASITARIAS

Las VEs han sido aisladas y caracterizadas en diferentes clases de patógenos, incluyendo virus, bacterias, hongos y parásitos (Schorey et al., 2015), y pueden derivar del patógeno directamente o del hospedador infectado.

Los primeros estudios de VEs en parásitos protozoarios se realizaron utilizando *Toxoplasma gondii*, un protozoo parásito del filo Apicomplexa, donde se comprobó que los

exosomas aislados de células dendríticas cultivadas con proteínas del parásito eran capaces de estimular una respuesta inmune protectora contra la infección aguda y crónica (Aline et al., 2004).

Para el caso de *Plasmodium sp*, las investigaciones se han enfocado en comparar exosomas derivados del hospedador versus exosomas producidos por el parásito (Schorey et al., 2015) y se ha visto que los exosomas aislados de sangre de ratones infectados con *Plasmodium yoelii* portan proteínas del parásito y son capaces de generar protección en los animales al estimular la producción de inmunoglobulinas G específicas (Martin-Jaular et al., 2011).

También, las VEs liberadas por *Leishmania sp* han sido ampliamente estudiadas (Atayde et al., 2016; Silverman and Reiner, 2011). Los análisis iniciales establecieron que los exosomas derivados del parásito son un vehículo para la secreción de proteínas y su captura para macrófagos (Silverman et al., 2010), por lo que se propuso que la liberación de exosomas constituía un mecanismo de entrega directa de moléculas del parásito a estas células (Schorey et al., 2015). Además, los exosomas de este parásito son capaces de suprimir la respuesta inmune (Silverman et al., 2010).

Otros parásitos protozoarios en los cuales se han estudiado las VEs incluyen *Cryptosporidium parvum* (Hu et al., 2013) y *Trichomonas vaginalis* (Nievas et al., 2018; Twu et al., 2013).

En este escenario, podemos decir que la liberación de VEs posee especial relevancia en organismos parásitos, debido a que están involucradas en procesos vitales, específicos de éstos, como es el caso de la patogénesis, adaptación a nuevos ambientes, comunicación (ya sea entre parásito-parásito o parásito-hospedador), entre otros; otorgándole una gran capacidad para adaptarse al medio y tomar ventaja ante su hospedador.

Si bien se han descrito y caracterizado las VEs en muchos parásitos, en *G. lamblia* solo se ha demostrado previamente que el parásito libera MVs, sugiriendo que podrían contribuir a la patogenia de la enfermedad (Evans-Osses et al., 2017). Sin embargo, el origen de las vesículas, el contenido y la forma en la que se liberan aún no están claros. *G. lamblia* es un parásito de gran importancia no solo porque es el causante de una enfermedad muy frecuente, la giardiasis, sino también porque es un organismo tempranamente divergente en

la evolución (Sogin et al., 1989). Esta característica hace de éste un excelente modelo para el estudio de diferentes procesos celulares en eucariotas, ya que muchos de los hallazgos que se obtengan en este modelo biológico permitirían hacer inferencias acerca del comportamiento que podrían tener los mismos fenómenos en organismos más complejos.

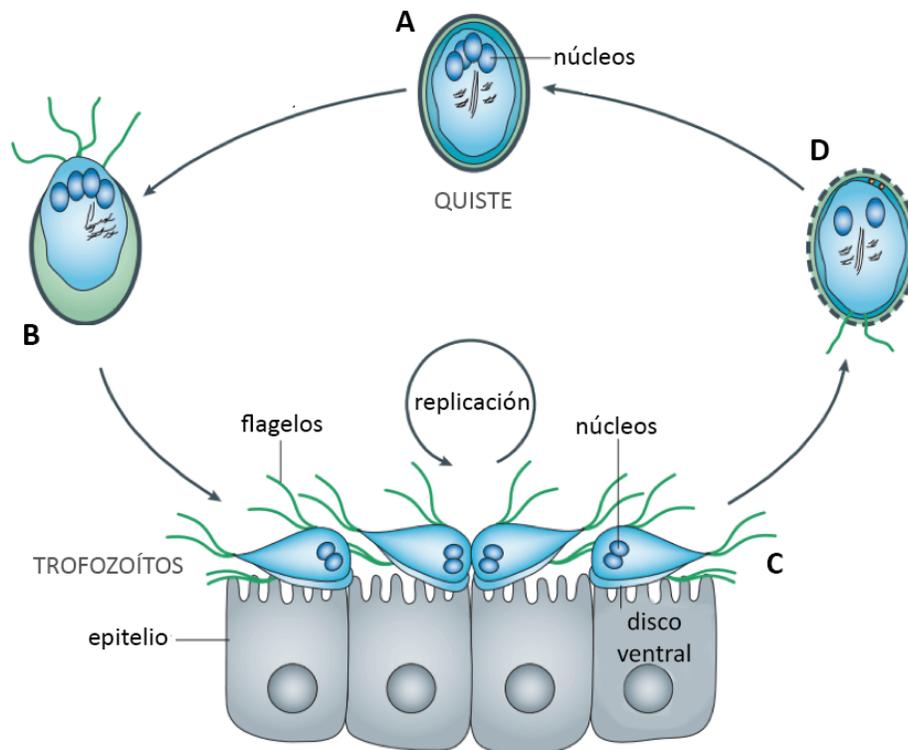
## **1.8 *Giardia lamblia***

### **1.8.1 Giardiasis, la enfermedad**

La *giardiasis* es una enfermedad intestinal causada por el parásito protozoario *Giardia lamblia* (sinónimos: *Giardia intestinalis*, *Giardia duodenalis*) y es la principal causa de diarrea no viral y no bacteriana a nivel mundial (Adam, 2001). Las infecciones por *G. lamblia* afectan a un gran número de personas, siendo más frecuentes en niños. Dado que muchas veces esta enfermedad se vincula con la pobreza, es que fue incorporada por la Organización Mundial de la Salud en el año 2004 a la lista de Enfermedades Desatendidas (Savioli et al., 2006). Esta infección parasitaria es cosmopolita y se ha encontrado que en países en desarrollo, donde los recursos sanitarios son deficientes, alrededor de 200 millones de personas presentan síntomas de giardiasis, detectándose además, medio millón de nuevos casos por año (Farthing et al., 1986; Fraser et al., 1997; Huang and White, 2006). En América Latina, se ha descripto que aproximadamente el 20% de la población rural presenta esta enfermedad y particularmente, en nuestro país, una recopilación de estudios aislados reveló que entre el 25 y 50% de los infantes argentinos son parasitados por *G. lamblia*.

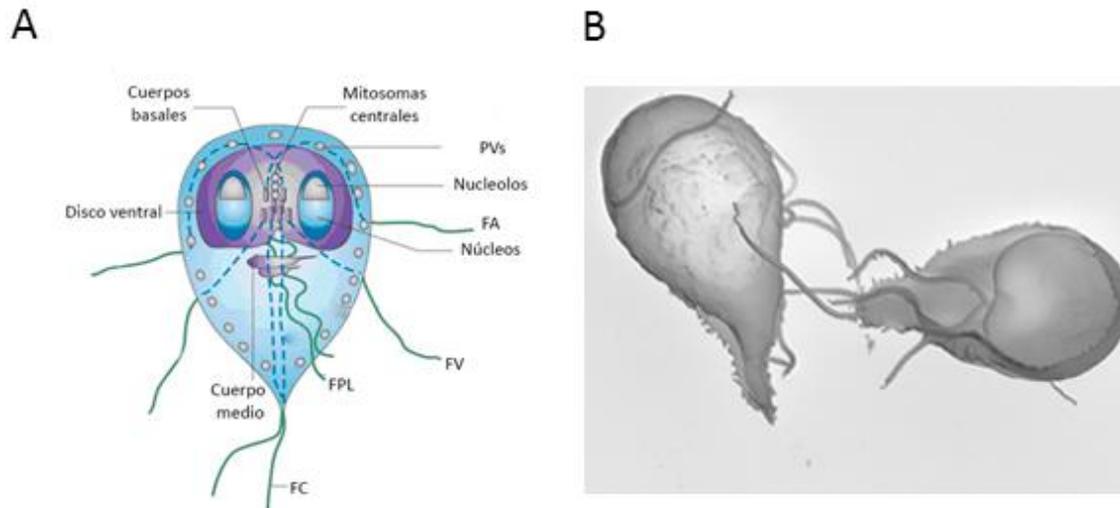
La sintomatología producida por la infección con *G. lamblia* es muy variada, dependiendo de factores tales como el sistema inmune del hospedador en el momento de la infección, la virulencia de la cepa, la dosis y la duración de la parasitosis. Entre las manifestaciones de una infección aguda se encuentran la deshidratación, la pérdida de peso y el dolor abdominal (Adam, 2001). Aunque en la mayoría de los individuos saludables la infección es limitada, una proporción puede contraer giardiasis crónica, desencadenando anorexia y síndrome de colon irritable, pudiendo provocar insuficiencia nutricional afectando el desarrollo físico e intelectual del hospedador (Fraser et al., 2000). En los últimos años, *G. lamblia* se ha encontrado en brotes transmitidos por aguas contaminadas tanto a nivel mundial (Efstratiou et al., 2017) como a nivel nacional (Basualdo et al., 2007).

*G. lamblia* posee un ciclo de vida simple, presentando dos estadios bien diferenciados: (1) el trofozoíto que coloniza el intestino y (2) el quiste, que es responsable de la infección y transmisión del parásito (**Figura 1.5**).



**Figura 1.5. Ciclo biológico de *Giardia lamblia*.** La infección comienza con la ingestión de quistes (**A**). A través de un proceso denominado desenquistamiento (**B**), que comienza en el estómago y culmina en el duodeno, se liberan los trofozoítos (**C**). Éstos, se duplican en el intestino delgado (fundamentalmente en el yeyuno) y, a medida que descienden por el intestino, son inducidos a enquistarse (**D**). Los quistes formados son finalmente eliminados con las heces cerrando el ciclo vital del parásito. Adaptado de (Ankarklev et al., 2010).

El trofozoíto de *G. lamblia* es piriforme, con una cara posterior convexa y una cara anterior cóncava, siendo el único protozoario que presenta simetría bilateral (**Figura 1.6**). El mismo mide aproximadamente de 9 a 15  $\mu\text{m}$  de largo y 5 a 9  $\mu\text{m}$  de ancho. Posee dos núcleos ovoides y diploides con envoltura nuclear y nucléolos (Adam, 2001).



**Figura 1.6. El trofozoíto de *G. lamblia*.** (A) Esquema del trofozoíto de *G. lamblia* conteniendo dos núcleos, las vacuolas periféricas (PVs), el disco ventral, funis y los cuerpos medios. Los flagelos están organizados en cuatro pares; FA anteriores, FPL posterolaterales, FV ventrales y FC caudales. Adaptado de (Ankarklev et al., 2010). (B) Microscopía de barrido de un trofozoíto de *G. lamblia*.

### 1.8.2 Transporte de proteínas

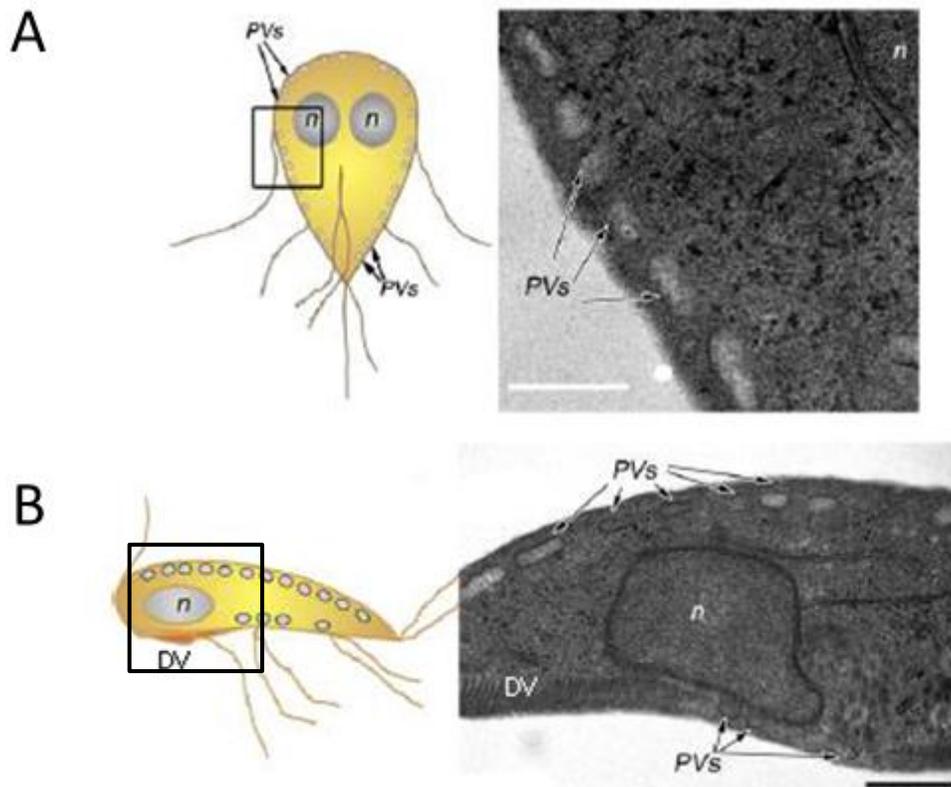
Durante más de treinta años, los laboratorios dedicados al estudio de la estructura subcelular de *G. lamblia* han proporcionado pruebas definitivas sobre la existencia de mecanismos específicos de transporte, distribución y secreción de proteínas en este parásito, aún en ausencia de un aparato de Golgi morfológicamente discernible y de un sistema endosomal/lisosomal clásico (**Figura 1.7**).

#### 1.8.2.1 Sistema endosomal/lisosomal en *Giardia lamblia*: Vacuolas periféricas

Las vacuolas periféricas o PVs (del inglés *Peripheral Vacuoles*) miden entre 200-300 nm, se encuentran ubicadas inmediatamente por debajo de la membrana plasmática (**Figura 1.6 y 1.7**) (Adam, 2001; Lanfredi-Rangel et al., 1998) y están presentes durante todo el ciclo de vida de *G. lamblia*.

Su naturaleza acídica fue demostrada por la internalización de naranja de acridina y sondas como LysoTracker y LysoSensor, que se acumulan selectivamente en compartimentos acídicos (Kattenbach et al., 1991; Lanfredi-Rangel et al., 1998; Touz et al., 2003). A través del análisis de pulso-caza con peroxidasa de rábano, se evidenció una marca temprana y persistente en las vacuolas sugiriendo que no hay distinción entre vesículas tempranas y tardías, como ocurre en otros organismos eucariotas (Lanfredi-Rangel et al., 1998). Por otro

lado, las características lisosomales de estas PVs se evidenciaron por la presencia y actividad de diversas enzimas hidrolasas, tales como fosfatasa ácida o AcPh (del inglés *Acid Phosphatase*), proteinasas y RNAsas (Feely and Dyer, 1987; Lindmark, 1988; Touz et al., 2003).



**Figura 1.7. Vacuolas periféricas: Sistema endosomal/lisosomal en *G. lamblia*.** (A) A la izquierda, dibujo de un trofozoíto de *G. lamblia* en donde se ilustran las PVs. A la derecha se muestra la región seleccionada, analizada por microscopía electrónica de transmisión, en donde se observan las PVs debajo de la membrana plasmática. (B) Vista lateral de un trofozoíto. A la izquierda, esquema de un trofozoíto. A la derecha, microscopía electrónica de transmisión correspondiente a la sección media, paralela al eje dorsoventral, que muestra las PVs distribuidas debajo de la membrana plasmática. n: núcleo, DV: disco ventral (organela de fijación). Barra de escala: 500 nm.

Finalmente, su potencial rol en la endocitosis fue sugerido luego de observar que estas vacuolas concentran ferritina exógena, luciferina amarilla, y también lipoproteína de baja densidad y quilomicrones a través de su receptor LRP (del inglés *Lipoprotein Receptor-related Protein*) (Bockman and Winborn, 1968; Lanfredi-Rangel et al., 1998; Rivero et al., 2011; Rivero et al., 2013). Es por las características observadas que se ha postulado que las PVs cumplirían simultáneamente funciones de endosomas y lisosomas, teniendo que coordinar

específicamente ambas acciones para efectuar exitosamente los procesos de endocitosis (Lanfredi-Rangel et al., 1998) y de degradación de proteínas (Lujan and Touz, 2003), así como los de fusión con la membrana plasmática y secreción de proteínas durante el enquistamiento (Touz et al., 2003) y desenquistamiento (Slavin et al., 2002).

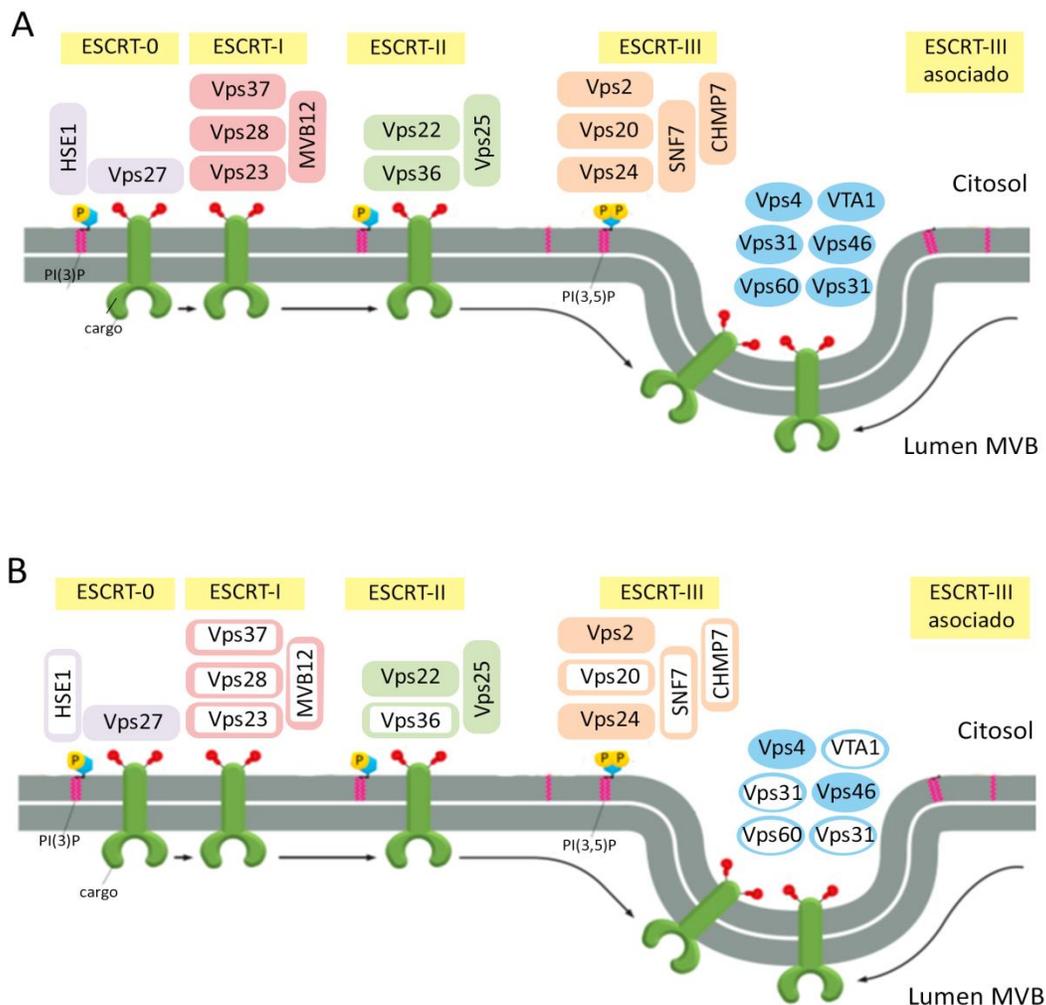
Como se mencionó anteriormente, en las células eucariotas la formación de MVBs es un paso importante en el proceso endocítico, principalmente en la captación de nutrientes y en la remodelación de receptores de membrana (Williams and Urbe, 2007). Estudios previos muestran que la mayoría de los endosomas tempranos aparecen como estructuras tubulovesiculares, mientras que en los endosomas tardíos presentan características típicas de MVBs y son capaces de fusionarse con los lisosomas (Luzio et al., 2000). Los MVBs generalmente poseen un diámetro medio de 400-500 nm (Gruenberg and Stenmark, 2004) y contienen en su interior pequeñas ILVs de alrededor de 50 nm de diámetro (Williams and Urbe, 2007). En *G. lamblia*, las PVs cumplen el rol de endosomas y lisosomas (Lanfredi-Rangel et al., 1998) y están involucradas en el tráfico de moléculas (Faso and Hehl, 2011); por lo tanto, las PVs podrían ser capaces de actuar como MVBs. Revisando la bibliografía de *G. lamblia*, se pudo observar que algunas PVs mostraban al menos una ILV en fotografías de microscopía electrónica de transmisión pero no fue hasta 2019 que Midlej y col. mostraron que las PVs contenían ILVs cuando eran estimuladas con  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , sugiriendo que las PVs podrían también cumplir el rol de MVBs en este parásito (Midlej et al., 2019).

### 1.8.3. Maquinaria ESCRT en *Giardia lamblia*

Cómo mencionamos anteriormente, la formación de MVBs está modulada, en parte, por una familia de proteínas conocidas como ESCRT (Herman et al., 2011). Análisis de secuencias homólogas en la base de datos de *Giardia* (GiardiaDB: <https://giardiadb.org/giardiadb/>) mostró que *G. lamblia* codifica para una maquinaria ESCRT muy simple (Leung et al., 2008; Saha et al., 2018), teniendo solo algunas de todas las proteínas ESCRT presentes en mamíferos (**Figura 1.8**). A pesar del conjunto reducido de subunidades ESCRT, datos recientes mostraron que todas las subunidades presentes en el genoma de *G. lamblia* se expresan en trofozoítos y quistes y que, al menos GIVps25, GIVps2, GIVps4a, GIVps4b y GIVps4c son funcionales en *Saccharomyces cerevisiae*, argumentando así en favor de una maquinaria ESCRT funcional en este parásito (Saha et al., 2018). Aunque no se determinó la función de estas proteínas ESCRT en *G. lamblia*, se mostró que algunas

subunidades del complejo conservan su función ancestral. Además, se identificó una proteína que contiene el dominio FYVE, que se une preferentemente al fosfoinosítido PI3P y cuya expresión *in vivo*, mostró una localización selectiva en endosomas enriquecidos en PI3P en *S. cerevisiae*, sugiriendo que podría ser una proteína ortóloga a Vps27 (Sinha et al., 2011).

En un análisis de la evolución de los componentes del complejo ESCRT y la presencia de MVBs, Field y colaboradores demostraron que, aunque el género *Giardia* tiene una divergencia evolutiva extrema y a menudo resulta en la falta de recuperación de los candidatos a ortólogos, esto no explica la falla completa en la detección de secuencias que codifican para las proteínas, lo que sugiere que una maquinaria minimizada de ESCRT/MVBs probablemente sea el resultado de un sistema endocítico inusual en este parásito (Field and Dacks, 2009).



**Figura 1.8. Maquinaria ESCRT.** (A) Esquema de la maquinaria ESCRT presente en mamíferos. (B) *G. lamblia* presenta un complejo ESCRT reducido. Las proteínas descritas en el parásito se representan en rectángulos y elipses completos.

De todo lo expuesto, surgieron diversos interrogantes que dieron origen a este trabajo de tesis, algunos de ellos son: *¿Posee G. lamblia la capacidad de liberar al medio extracelular diferentes tipos de VEs? ¿La diferencia de patogenicidad de los ensamblajes A y B podría estar dada por diferencias en el contenido de proteínas de las VEs? Y, finalmente, ¿Cómo se encuentra regulado el proceso de formación de vesículas con características de exosomas?*

Para responder a estos interrogantes se llevaron a cabo diversos ensayos de bioquímica, biología celular y molecular. Así, en la **PARTE I** de Resultados se describen las características principales de los diferentes tipos de VEs en los ensamblajes A y B de *G. lamblia*; mientras que en la **PARTE II**, se analiza la participación de proteínas claves en la formación y/o liberación de tExo.

# Hipótesis y Objetivos

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 HIPÓTESIS

Los ensamblajes A y B de *Giardia lamblia* liberan al medio extracelular diferentes tipos de vesículas.

### 2.2 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general planteado en este trabajo de tesis es analizar la presencia de VEs en *Giardia lamblia* e identificar los mecanismos implicados en la formación y/o liberación de las mismas.

### 2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

#### **1. Caracterizar las VEs de dos cepas con diferente patogenicidad de *Giardia lamblia***

- Poner a punto, aislar y caracterizar mediante microscopia electrónica las VEs liberadas al medio extracelular de trofozoítos del ensamblaje A y B.
- Analizar y comparar el proteoma de las VEs provenientes de trofozoítos de ambos ensamblajes.

#### **2. Evaluar la participación de *GIVps4a* y *GIRab11* en la formación y liberación de exosomas en *G. lamblia***

- Caracterizar las vesículas del tipo exosomas mediante diferentes metodologías, teniendo en cuenta forma, tamaño y presencia de marcadores típicos.
- Estudiar la expresión y localización subcelular de *GIVps4a* y *GIRab11* en trofozoítos transfectados.
- Determinar si *GIVps4a* y *GIRab11* están involucradas en la formación y/o liberación de exosomas en *G. lamblia*.
- Examinar si variaciones en la expresión de *GIVps4a* y *GIRab11* producen cambios morfológicos internos en trofozoítos transfectados.

# Materiales y Métodos

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 ORGANISMOS Y CULTIVO *IN VITRO*

Los trofozoítos de *G. lamblia* se adquirieron de la *American Type Culture Collection* (ATCC 50582) y son provenientes de la cepa *WB*, clon 1267 y clon C6 y de la cepa *GS* clon H7 (Gillin et al., 1990). Para cultivarlos axénicamente se utilizó medio TYI-S-33 (pH 7) suplementado con 10 % de suero bovino adulto y 5 % de bilis bovina (medio completo de crecimiento) (Diamond et al., 1978). Los cultivos se crecieron en tubos de borosilicato de 14 mL con tapa a rosca (Eurotubo®, Deltalab), los cuales fueron incubados a 37°C hasta alcanzar la fase exponencial u otra etapa dependiendo del experimento. Durante el crecimiento de los trofozoítos los tubos se mantuvieron con una inclinación de 30°, lo que permitió una mayor adhesión a las paredes del tubo. Para cosechar las células, se cambió el medio de cultivo por medio nuevo o por buffer fosfato o PBS (del inglés *Phosphate Buffer Saline*; 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,7 mM KCl; 135 mM NaCl) y se incubaron los tubos a 4°C durante 15 min para permitir la suelta de los trofozoítos de las paredes. Por último, los cultivos se centrifugaron 15 min a 1455 x g a 4°C.

##### 3.1.1 Aislamiento de vesículas extracelulares utilizando el medio M199 modificado

Para la extracción de vesículas extracelulares se partió de trofozoítos salvajes *WB/C6* y *GS/H7*. Se lavaron dos veces con PBS estéril y se incubaron 16 hs con el medio M199 modificado (6 mM ácido ascórbico, 6 mM L-cisteína y 55 mM glucosa). Luego, se realizó una centrifugación a 1455 x g por 15 min para eliminar células muertas y el sobrenadante se centrifugó a 10.000 x g para obtener las vesículas del tipo microvesículas (tMVs). Se aisló nuevamente el sobrenadante y se ultracentrifugó a 100.000 x g durante 90 min utilizando el rotor 45Ti (Beckman-coulter L-70 Ultracentrifuge). El pellet se lavó con PBS y se ultracentrifugó nuevamente a 100.000 x g durante 90 min. El precipitado de tExo fue resuspendido en PBS, o en diferentes tipos de soluciones según el análisis a realizar. Todos los pasos de centrifugación se llevaron a cabo a 4°C.

##### 3.1.2 Tinción negativa de vesículas extracelulares

Las tMVs y tExo de *G. lamblia* se examinaron mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). Las fracción enriquecida fue diluida en PBS y ambas VEs se sometieron a tinción negativa. Las muestras se colocaron sobre grillas de cobre y se incubaron 15 min a

temperatura ambiente, luego se contrastaron 30 segundos con acetato de uranilo acuoso al 2%. Las muestras se examinaron con un microscopio electrónico Zeiss 109. Este experimento se realizó en colaboración con la Dra. Adriana Lanfredi Rangel (Unidade de Microscopia Eletrônica, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Salvador, Bahía, Brasil).

### 3.1.3 Recuento de la viabilidad celular

El recuento de la viabilidad celular se realizó mezclando partes iguales de la suspensión celular a cuantificar con Azul de Tripano al 0,5% en PBS. Se colocó una gota de dicha dilución en una cámara Neubauer y se procedió al recuento de las células viables por observación directa al microscopio. La fórmula para el contaje de la concentración celular fue:  $\text{N}^\circ \text{ de células viables/mL} = 10.000 \times \text{N}^\circ \text{ células contadas en la cámara} \times 2 \text{ (dilución)}$ .

### 3.1.4 Espectrometría de masa

Las proteínas se separaron en un gel NuPAGE 4-12% (Invitrogen) y se colorearon mediante tinción con azul de Coomassie. Cada línea de gel se cortó en 12-15 rebanadas contiguas, se trató con ditioneitol (DTT) 10 mM y iodoacetamina, y se digirió con 10  $\mu\text{l}$  de Tripsina (0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) (Promega Corporation), según lo descrito por Shevchenko (Shevchenko et al., 1996).

Las mezclas de péptidos se analizaron mediante cromatografía líquida de fase inversa de nanoflujo-espectrometría de masas en tándem (nLC-MS / MS) utilizando un espectrómetro de masas acoplado en línea con una trampa de iones lineal (LTQ; Thermo). Los péptidos se desalaron en una columna trampa y se separaron en un capilar de sílice de 10 cm como se describió previamente (Cucco et al., 2018).

Los espectros de masa en tándem se adquirieron en modo dependiente de datos y se buscaron contra las proteínas de *G. lamblia* (cepa WBC6/GSH7) de la base de datos NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) usando software Proteome Discoverer versión 1.4 (Thermo Electron) que combina coincidencias espectrales con un nodo Percolator, con una tasa de descubrimiento falso basada en el valor  $q$  de 0.01. Solo las proteínas identificadas con al menos dos péptidos y las proteínas detectadas en al menos tres réplicas se consideraron para su posterior análisis. Los análisis se realizaron por triplicado. Se realizó un análisis cuantitativo comparando las proteínas encontradas en tMV y tExo. La abundancia de proteínas se estimó utilizando los valores del factor de abundancia espectral normalizada (NSAF) calculados, normalizando los recuentos espectrales frente a la longitud de la proteína y la suma de los

recuentos espectrales en la corrida correspondiente. La identificación de péptidos se realizó utilizando el método propuesto por Pavelka et al. (Pavelka et al., 2004), aplicado efectivamente a la cuantificación del proteoma basada en el recuento espectral (Pavelka et al., 2008), mostrando una buena compensación de especificidad de sensibilidad. Este método consiste en estadísticas de relación señal/ruido (SNR) mejoradas mediante estimaciones específicas de proteínas de la desviación estándar derivadas del modelo de error global de ley de potencia (PLGEM), que describe bien la dependencia de la desviación estándar versus la media en conjuntos de datos NSAF. Luego, se aplica un algoritmo basado en remuestreo para múltiples ajustes de prueba para controlar la tasa de falsos positivos (FPR). El método PLGEM-STN se aplicó utilizando el paquete Bioconductor 'plgem' (Gentleman et al., 2004) en modo paso a paso (Pavelka et al., 2004). Nuestro conjunto de datos NSAF mostró un buen ajuste al PLGEM ( $r^2$  ajustado = 0.996); PLGEM-STN se utilizó así para comparar los valores de NSAF de proteínas presentes en tMVs y tExo. Se aplicó una corrección de prueba múltiple, estableciendo en "plgem" un remuestreo de 1,000 iteraciones y un "delta" (parámetro para la estimación de FPR) de 0.05. El cambio de pliegue (FC) para cada proteína se estimó como el  $\log_2$  de la relación promedio NSAF (tExo) / promedio NSAF (tMVs). Las proteínas que muestran valores de P ajustados de  $<0.05$  y  $|FC| > 0.6$  se predijeron como expresados diferencialmente en nuestro conjunto de datos. Las proteínas identificadas se agruparon por función biológica.

### 3.1.5 Aislamiento selectivo de vesículas tipo exosomas utilizando el medio TYI-S-33 carente de suero bovino adulto o bilis bovina (TYI-S-33/-sbb)

Para la extracción de tExo, se partió de  $14 \times 10^7$  trofozoítos salvajes *wb/1267* y trofozoítos transgénicos *glvps4a-ha*, *as-glvps4a*, *glvps4a<sub>E228Q</sub>-ha*, *glrab11-ha* y *ds-glrab11*. Los trofozoítos se lavaron dos veces con PBS estéril y se incubaron 4 hs en medio completo de crecimiento sin el agregado de suero bovino adulto o bilis bovina (TYI-S-33/-sbb), ya que el suero y la bilis contienen exosomas que pueden interferir con análisis posteriores. Luego, se realizó una centrifugación a  $1455 \times g$  por 15 min para eliminar células muertas y el sobrenadante se filtró utilizando filtros con poros de  $0.11 \mu\text{m}$  (Millipore). Finalmente, el sobrenadante filtrado se ultracentrifugó a  $100.000 \times g$  durante 200 min utilizando el rotor 60Ti (Beckman-coulter L-70 Ultracentrifuge). El precipitado conteniendo tExo fue resuspendido en PBS, o en diferentes tipos de soluciones según el análisis a realizar. Todos los pasos de centrifugación se llevaron a cabo a  $4^\circ\text{C}$ .

### 3.1.6 Dispersión dinámica de la luz (DLS)

Para analizar el tamaño de las vesículas presentes en la muestra, las tExo se purificaron como se detalla en la sección 3.12.2 y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de PBS. La distribución de tamaños se midió por dispersión dinámica de la luz o DLS (del inglés *Dynamic Light Scattering*) usando un Zetasizer Nano ZS ZEN3600 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). Todas las mediciones se realizaron por duplicado a 25°C. El procesamiento y análisis de datos se realizó con el software Zetasizer versión 7.03.

### 3.1.7 Gradiente de sacarosa

Para la purificación de vesículas según su tamaño se utilizó un gradiente de sacarosa. Para ello se obtuvo el pellet conteniendo tExo (**ver SECCIÓN 3.12.2**) y el mismo se resuspendió en 300  $\mu$ L de una solución de 2.5 M sacarosa, 20 mM Hepes/NaOH, pH 7.2, luego se creó un gradiente lineal de sacarosa (2 M-0.25 M sacarosa, 20 mM Hepes/NaOH, pH 7.2) y se centrifugó a 100.000  $\times g$  por 15 hs utilizando el rotor TLV.100 (Beckman-coulter Optima Max-XP Ultracentrifuge). Se recolectaron las 7 fracciones desde la parte superior del tubo. Cada fracción se diluyó en 300  $\mu$ L de PBS y se centrifugó durante 1 h a 200.000  $\times g$ , utilizando el rotor TLV.100 (Beckman-coulter Optima Max-XP Ultracentrifuge) (Raposo et al., 1996).

## 3.2 MANIPULACIÓN DEL ADN

### 3.2.1 Obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico y plasmídico de *Giardia lamblia*

El ADN genómico de trofozoítos de *G. lamblia* fue purificado siguiendo el protocolo de extracción con fenol y precipitación con alcohol isopropílico descrito por Sambrook J et al 1989 (Sambrook J et al 1989).

Para la obtención de ADN plasmídico, se crecieron cultivos bacterianos hasta saturación los cuales fueron centrifugados a 3500  $\times g$  por 8 min a 20°C. Los plásmidos se purificaron utilizando el sistema comercial *Wizard® Plus SV Minipreps* (Promega), siguiendo las indicaciones suministradas por el fabricante. Los plásmidos utilizados en este trabajo se muestran en la **Tabla 3.1**. La calidad del ADN extraído en todos los casos se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % p/v.

Plásmido	Descripción
pGIVps4ap-HA	Permite la sobre-expresión de GIVps4a-HA
pGIVps4a <sub>E228Q</sub> -HA	Permite la sobre-expresión de GIVps4a <sub>E228Q</sub> -HA
pGIVps4ap-AS	Regula negativamente la expresión de GIVps4ap
pGIRab11p-HA	Permite la sobre-expresión de GIRab11p-HA
pdsRNAGIRab11p	Regula negativamente la expresión de GIRab11p

**Tabla 3.1. Plásmidos utilizados en este trabajo.**

### 3.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa, purificación y corte con enzimas de restricción de los fragmentos de ADN

Las amplificaciones de los fragmentos de ADN a partir de ADN genómico se realizaron mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa o *PCR* (del inglés *Polymerase Chain Reaction*). Las reacciones se llevaron a cabo empleando la enzima *Taq platinum High Fidelity* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, US), de acuerdo a las siguientes condiciones de reacción: 2 min a 94°C, 30 ciclos de [30 s a 94°C, 30 s a 55°C y 2 min a 72°C] y luego 10 min a 72°C para la extensión final.

Las reacciones de *PCR* en colonia se realizaron para la detección rápida de los clones bacterianos positivos. Se tomaron las colonias con palillos estériles y se resuspendieron en 50 µL de agua Milli-Q y se utilizaron estas suspensiones como molde para la reacción. Las amplificaciones se realizaron utilizando la enzima *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, US), de acuerdo con las siguiente condiciones: 2 min a 94°C, 30 ciclos de [30 s a 94°C, 30 s a 55°C y 2 min a 72°C] y luego 10 min a 72°C para la extensión final. Se incluyó como control negativo un tubo de reacción en el cual se reemplazó el volumen de ADN por un volumen igual de agua Milli-Q. Además, se incluyeron controles positivos específicos para cada experimento.

Los cebadores utilizados durante las reacciones de *PCR* se muestran en la **Tabla 3.2**, fueron sintetizados por Invitrogen (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, US) y almacenados a -20°C. Los productos de *PCR* fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1 % p/v.

Las digestiones de ADN se realizaron utilizando endonucleasas de restricción y soluciones comerciales (Promega). Las condiciones de reacción fueron las especificadas en los catálogos suministrados por el proveedor, utilizando volúmenes de reacción de 30 o 50 µL. Las purificaciones de los fragmentos de *PCR* o de los plásmidos linealizados se llevaron a cabo

utilizando sistemas de purificación comerciales, tales como *Wizard SV Gel* y *PCR Clean Up system* (Promega), siguiendo las indicaciones suministradas por el fabricante.

Cebadores	Secuencia	Sitio de restricción
GlVps4a fw	5' CATT <u>CCATGG</u> CCATTGTTCTGCTGCGAAACATTG	<i>NcoI</i>
GlVps4a rv	5' CATT <u>GTATAC</u> GTTGGAGCCGAACTCCGCTGTGAACTT	<i>Bstz171</i>
GlRab11 fw	5' CAAT <u>GGGCC</u> ACTGACGCGTACGACCATCTTTA	<i>Apal</i>
GlRab11 rv	5' CAAT <u>CCCGGG</u> GCAACGCTTCTTTTGTCTAGTCTTTGCT	<i>SmaI</i>
GlVps4a <sub>E228Q</sub> fw	5' GCGGGCAGACTGGCCGACGTA	
GlVps4a <sub>E228Q</sub> rv	5' AAGTACGTCGGCCAGTCTGCCCGCC	
GlVps4a as fw	5' CAAT <u>GATATC</u> CCATTGTTCTGCTGCGAAACATTG	<i>EcoRV</i>
GlVps4a as rv	5' CAAT <u>CCATGG</u> CTCATCTGCTAGCACATTGGGCGT	<i>NcoI</i>
GlRab11p ds fw	5' CAAT <u>GGATCC</u> ACTGACGCGTACGACCATCTTTA	<i>BamHI</i>
GlRab11p ds rv	5' CATT <u>GCATGC</u> GCAACGCTTCTTTTGTCTAGTCTTTGCT	<i>SphI</i>

**Tabla 3.2. Cebadores para PCR.** Se muestran las secuencias de los cebadores utilizados. En las mismas se encuentran subrayados los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción utilizadas. Fw: sentido Rv: antisentido.

### 3.2.3 Ligación de fragmentos de ADN

Los insertos y plásmidos se ligaron en una relación 4:1, respectivamente, mediante la incubación con la enzima T4 DNA Ligasa (Fermentans) por 16 hs a 16°C, seguido de 10 min a 70°C para inactivar la enzima.

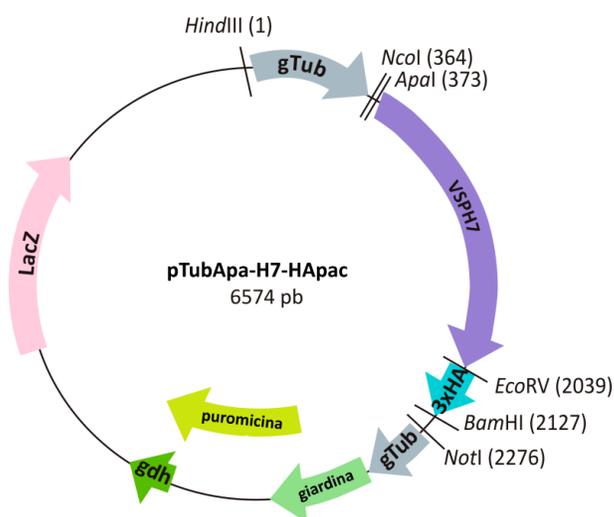
### 3.2.4 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

Las electroforesis de ácidos nucleicos se realizaron en geles de agarosa. Se utilizó una concentración de agarosa al 1% preparada en solución amortiguadora TAE (Tris-acetato 40 mM pH = 8; ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM y se le agregó SYBR® Safe DNA Stain (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, US) para el tinte de las bandas. Las muestras se mezclaron con solución de siembra (Azul de bromofenol 0,09 %p/v, Xileno Cianol FF 0,09 %v/v, Glicerol 60 %v/v). Las corridas electroforéticas fueron realizadas en solución amortiguadora TAE a una intensidad de corriente constante de 100 V durante 40 min. Una vez finalizada la corrida electroforética, los geles se visualizaron mediante la exposición a Safe Image TM Blue-Light Transiluminator (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, US). Como marcador de peso molecular se utilizó 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, US).

### 3.3 CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN EN *Giardia lamblia*

#### 3.3.1 Amplificación y sobreexpresión de las proteínas GLVps4a y GIRab11

El plásmido **pTubApa-H7-HApac** (**Figura. 3.1**) permite la expresión constitutiva y estable de genes en trofozoítos de *G. lamblia*, gracias a la presencia del promotor de tubulina y a la selección con el antibiótico puromicina. El *cassette* de resistencia a la puromicina se encuentra bajo el control de un promotor endógeno no regulado de *giardina* y *gdh*. Las proteínas se expresaron fusionadas a 3 repeticiones en tándem del epítipo de hemaglutinina (HA) del subtipo H3 del virus influenza (YPYDPVDYA) en el extremo C-terminal (Touz et al., 2004; Touz et al., 2003; Touz et al., 2002).



**Figura 3.1. Plásmido pTubApa-H7-HApac.** El plásmido original expresa a la proteína VSPH7-HA mediante promotores de tubulina. Contiene además el gen de *puromicina* y *LacZ* para expresar células de manera estable en *G. lamblia* y *Escherichia coli*, respectivamente. Para clonar un nuevo gen que exprese una proteína de fusión-HA, el plásmido puede ser restringido con las enzimas *NcoI* o *ApaI* (región 5') y *EcoRV* (región 3').

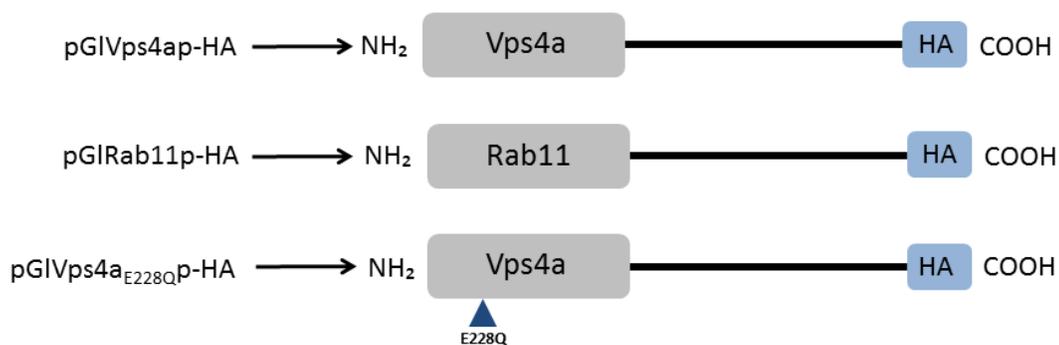
Se amplificaron las secuencias que codifican para los genes *glvps4a* (1365 pb) y *glrab11* (651 pb) mediante *PCR*, utilizando como molde ADN genómico extraído de trofozoítos de *G. lamblia* WB/1267, tal como se describe en la sección 3.2.1. Para ello se utilizaron cebadores específicos para cada caso (**Tabla 3.1**), a los que se agregaron los sitios de restricción necesarios para el clonado en el plásmido **pTubApa-H7-HApac** (**Figura 3.1**). Para la amplificación por *PCR* se utilizó la enzima *Taq platinum High Fidelity* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, US), la cual proporciona una alta fidelidad. Se utilizó el protocolo de *PCR* siguiendo las indicaciones del fabricante.

Los productos de *PCR* se cortaron y se purificaron mediante las técnicas descritas anteriormente y luego se clonaron en el plásmido **pTubApa-H7-HA**pac dando lugar a la creación de los plásmidos **pGIVps4a-HA**pac y **pGIRab11-HA**pac (**Figura 3.2**), respectivamente. La presencia de los insertos fue analizada por *PCR* utilizando los cebadores específicos y confirmada por secuenciación.

### 3.3.2 Mutagénesis sitio dirigida y sobreexpresión de la mutante GIVps4a<sub>E228Q</sub>

La sustitución del aminoácido ácido glutámico (E) por glutamina (Q) en la posición 228 de GIVps4a, se realizó mediante una mutación puntual en la posición 684 del gen *glvps4a*. Para ello, se diseñaron dos cebadores oligonucleotídicos mutagénicos complementarios basados en la secuencia de *glvps4a* (**Tabla 3.1**), con la mutación puntual, empleando el programa de Stratagene “QuickChange Primer Design Program” (<http://www.stratagene.com/sdmdesigner>). El ensayo de mutagénesis se realizó utilizando un kit QuikChange, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Stratagene) (Touz et al., 2005; Touz et al., 2004). Brevemente, se llevó a cabo la reacción de *PCR* utilizando los cebadores y el plásmido **pGIVps4a-HA**pac como templado. Al final de la reacción, el producto se incubó con la enzima de restricción *DpnI*, la cual digiere el ADN de doble cadena super-enrollado (no mutado), por 1 h a 37°C.

El producto obtenido fue utilizado para transformar bacterias Top10, los clones positivos fueron chequeados por *PCR* y luego la mutación puntual se confirmó por secuenciación (**Figura 3.2**).



**Figura 3.2. Representación esquemática de las proteínas de fusión obtenidas a partir de los plásmidos GIVps4a y GIRab11, las cuales poseen 3x epítopes HA en el extremo C-terminal.** Todos los plásmidos muestran los dominios Vps4a y Rab11, las secuencias C-terminal y la etiqueta HA, dirigido por el promotor de tubulina (flechas) para **pGIVps4a-HA**, **pGIRab11p-HA** y **pGIVps4a<sub>E228Q</sub>p-HA**, respectivamente. La posición de la mutación puntual (E228Q) se muestra por debajo de la estructura génica de la mutante.

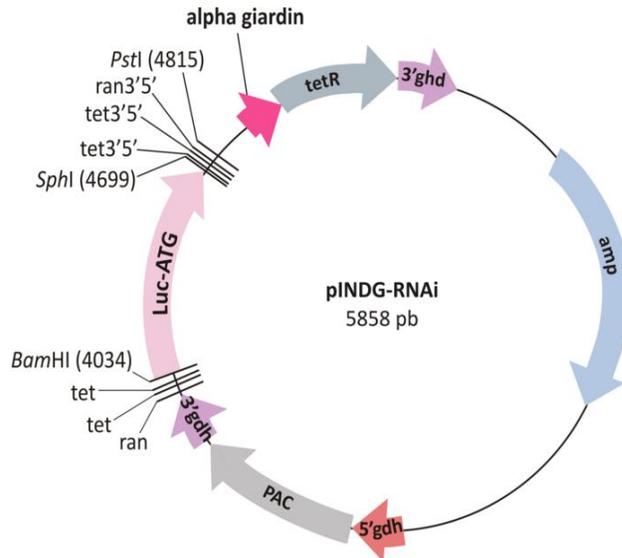
### 3.3.3 Inhibición de la expresión de GIVps4a en *Giardia lamblia*

Los nucleótidos del 1 al 1035 pertenecientes al marco abierto de lectura o ORF (del inglés *Open Reading Frame*) de *glvps4a* fueron amplificados mediante *PCR* utilizando cebadores específicos que se detallan en la **Tabla 3.1**. El producto de *PCR* se cortó y se purificó mediante las técnicas descritas anteriormente y luego se introdujo en el plásmido pTubApa-H7-HApac (**Figura. 3.1**). El inserto se clonó en el plásmido en dirección opuesta resultando en un plásmido antisentido (pGIVps4a-AS) (**Figura. 3.4**) que fue utilizado para la inhibición de la expresión de GIVps4a.

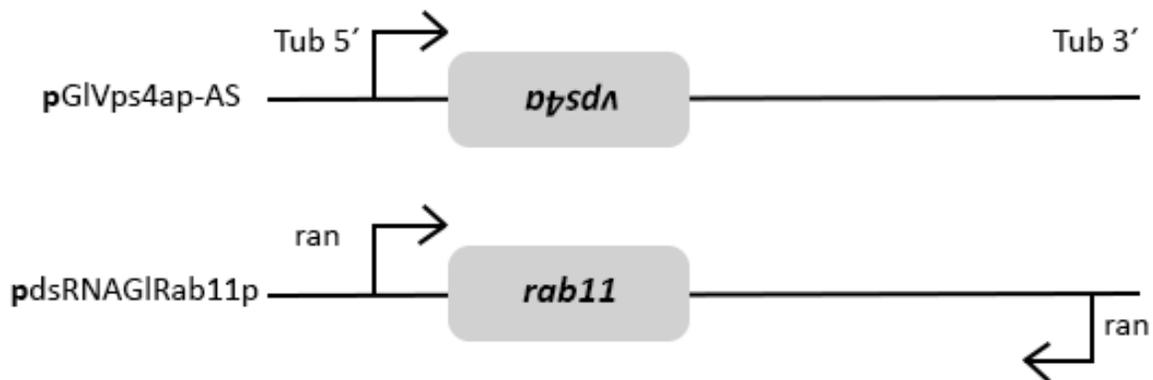
La presencia de inserto fue analizada por *PCR* utilizando los cebadores específicos y confirmada por secuenciación. La depleción del ARNm de *glvps4a* fue evaluado por *PCR* en tiempo real, como se describe en detalle en las secciones siguientes.

### 3.3.4 Inhibición de la expresión de GRab11 en *Giardia lamblia*

Para reducir la expresión de GRab11p, se utilizó el plásmido pINDG-RNAi, el cuál fue generado en nuestro laboratorio. Dicho plásmido permite la expresión inducible del ARN de doble cadena (ARNdc) en *G. lamblia* (GenBank GU395185) (Rivero et al., 2010; Touz et al., 2004) (**Figura 3.3**). Para silenciar el gen *glrab11* el fragmento de ADN perteneciente al gen *glrab11* fue amplificado por *PCR* utilizando cebadores específicos (**Tabla 3.1**). Luego de la digestión con las enzimas de restricción correspondiente y de la purificación, se clonó en el plásmido pINDG-RNAi dando como resultado el plásmido pdsRNArab11 (**Figura. 3.4**). La presencia de inserto fue analizada por *PCR* utilizando los cebadores específicos y confirmada por secuenciación. La expresión del ARNdc fue inducida con tetraciclina (Tet) (10 µg/mL) durante 48 hs. La producción del ARNdc y la depleción del ARNm de *glrab11p* fue evaluada por *PCR* en tiempo real, como se describe en detalle más adelante.



**Figura 3.3. Plásmido inducible pINDG-RNAi.** Este plásmido se desarrolló para la expresión inducible de ARN de doble cadena de *G. lamblia*. Contiene promotores opuestos *ran* de *G. lamblia*, elementos operadores de Tet y está diseñado para la inserción y expresión de productos de PCR de doble cadena. Este plásmido contiene además un casete de puromicina bajo el control del promotor endógeno no regulado de *gdh*. A partir de ADN genómico de *G. lamblia* se amplificó la secuencia de *glrab11p* por PCR y se introdujo entre los promotores opuestos *ran* inducibles por Tet.



**Figura 3.4. Representación esquemática de los plásmidos de pGIVps4ap-AS y pdsRNAGIRab11p.** El plásmido pGIVps4a-AS contiene los nucleótidos del 1 al 1035 pertenecientes al ORF de *glvps4a* que se clonaron en el plásmido en dirección opuesta resultando en un plásmido antisentido que fue utilizado para la inhibición de la expresión de GIVps4a. El fragmento de ADN perteneciente al gen *glrab11* se clonó en el plásmido pINDG-RNAi que permite la expresión inducible del ARN de doble cadena mediante Tet.

### 3.3.5 Secuenciación de moléculas de ADN

Las secuencias de los constructos fueron enviadas para su secuenciación a la compañía MacroGen (<http://www.macrogen.com>). Las reacciones de secuenciación se realizaron utilizando cebadores específicos para la secuencia a evaluar.

## 3.4 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS

### 3.4.1 Método de transformación bacteriana

Para la obtención de células de *Escherichia coli* (Top10) competentes, se crecieron cultivos saturados en 5 mL de medio Luria Bertoni (LB) suplementado con Tet (Peptona 1 % p/v, Extracto de Levadura 0,5 % p/v, Tet 15 mg/mL en 100 mL de agua destilada) a 37°C en agitación constante durante toda la noche. Luego se realizó una dilución 1:250 de estos cultivos en medio fresco y se incubó 18°C en agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica igual a 0,6. El cultivo se incubó 10 min en hielo y luego se centrifugó a 2095 x g por 10 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en 80 mL de buffer TB frío (Pipes 10 mM, MnCl<sub>2</sub> 55 mM, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 15 mM, KCl 150 mM, pH 7). Las bacterias se incubaron nuevamente 10 min en hielo y se centrifugaron a 2095 x g por 10 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en 20 mL de buffer TB frío y se agregaron 1,5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) al 7%, de forma cuidadosa para evitar toxicidad en las células. Por último, las bacterias se fraccionaron en alícuotas de 200 µL en tubos estériles, congelándose en N<sub>2</sub> líquido, y manteniéndose a -70°C hasta su posterior utilización.

### 3.4.2 Transformación de *Escherichia coli*

Las bacterias Top10 competentes se transformaron con el plásmido conteniendo el gen de interés, mediante shock térmico: 15 min a 4°C, 30 s a 42°C y 2 min a 4°C. Luego, se adicionó 1 mL de LB y se dejó en agitación durante 1 h a 37°C. Después de centrifugar a 2851 x g durante 5 min, se retiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 200 µL de LB. Finalmente, las bacterias transformadas se sembraron en placas de Petri conteniendo LB-Ampicilina (25 mg/mL) agar 1,2 % y se incubaron toda la noche en estufa a 37°C.

## 3.5 TRANSFECCIÓN DE TROFOZOÍTOS DE *Giardia lamblia* CEPA WB/1267

Para cada una de las transfecciones se partió de trofozoítos en monocapa. Las células fueron enfriadas y centrifugadas a 1455 x g por 15 min a 4°C, el sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en 360 µL de medio completo adicionando 40 µg de plásmido. La

transfección se realizó mediante electroporación (Electro Square Porator™ ECM 830) aplicando 1 pulso de 14 ms a 350 V en una cubeta de 4 mm. Seguidamente, la muestra fue incubada en hielo durante 10 min y luego trasvasadas a un tubo de vidrio de 7 mL conteniendo medio completo y los antibióticos piperacilina (500 µg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US) y Moxalactam (333 µg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US). Luego de cultivar los trofozoítos a 37°C toda la noche, se agregó Puromicina (10 µg/mL) (Invitrogen, San Diego, CA, US), para seleccionar aquellas células que estuvieran transfectadas. La expresión de las proteínas de interés se visualizó mediante ensayos de inmunodetección.

### 3.6 RETROTRANSCRIPCIÓN SEGUIDA DE PCR EN TIEMPO REAL

#### 3.6.1 Extracción de ARN total

Las extracciones de ARN se realizaron utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen Corporation Carlsbad CA, US), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los trofozoítos de *G. lamblia* se homogeneizaron con 1 mL de Trizol. Luego se agregó cloroformo y se incubó a temperatura ambiente por 2 min y la mezcla se centrifugó a 12000 x g durante 15 min a 4°C. Brevemente, se realizaron 2 extracciones con cloroformo y se dejó precipitar el ARN durante 30 min a 4°C con 500 µL de isopropanol. Posteriormente, se centrifugó nuevamente a 12000 x g durante 10 min y, por último, se lavó el pellet con 70 % v/v de etanol y se dejó secar el precipitado. Una vez seco, el precipitado se resuspendió en agua estéril libre de ARNasa y se realizó una segunda purificación utilizando el sistema de ARN total SV (Promega, Madison, WI, US). La cuantificación del ARN obtenido se realizó con Nanodrop (Thermo scientific) y su integridad se comprobó mediante electroforesis de ácidos nucleicos (ver sección 3.2.4).

#### 3.6.2 Síntesis de ADNc

Para la síntesis del ADN complementario (ADNc), el ARN extraído fue tratado con ADNasa (Promega, Madison, WI, US), previo a la síntesis de ADNc con la enzima *Transcriptase Reversa RevertAid™* (Fermentas). La reacción de transcripción reversa fue realizada a 50°C por 30 min, seguido por la inactivación de la enzima a 95°C por 15 min.

#### 3.6.3 PCR en tiempo real (qRT-PCR)

Los ADNc fueron utilizados para el análisis de la expresión de genes utilizando la mezcla *PCR SYBR Green Master Mix* para PCR en tiempo real (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA), ADNc de simple cadena (100 ng), y cebadores en una concentración de 800

nM, en un volumen de reacción de 20  $\mu$ L. Los cebadores que se utilizaron se muestran en la **Tabla 3.4.**

Las corridas se realizaron en un sistema 7500 estándar (Applied Biosystems, USA). Las condiciones de *qRT-PCR* fueron: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C y 40 ciclos de [95°C por 15 seg y 60°C por 1 min]. La expresión génica fue normalizada utilizando el gen *18s* como gen de referencia y calculada utilizando el método  $\Delta\Delta Ct$ . El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo utilizando el programa *GraphPad Prism* (GraphPad Software, Inc.). El test-t fue utilizado para determinar las diferencias entre la cepa salvaje *wb/1267* (grupo control) y las células transgénicas *glvps4a-ha*, *glvps4a<sub>E228Q</sub>-ha*, *as-vps4a*, *glrab11-ha* y *ds-glrab11*. La significancia estadística se delimitó en un valor de  $p < 0.05$ . Los datos se representan como media  $\pm$  error estándar de la media.

Cebadores	Secuencia
18S fw	5' AAGACCGCCTCTGTCAATAA
18S rv	5' GTTTACGGCCGGGAATACG
glvps4a fw	5' CGGCGCTGAGAAGAAAGACT
glvps4a rv	5' CGCAACAGGCTACTCACAGT
glrab11 fw	5' TCTCGAGGTTCCACCAGCAAC
glrab11 rv	5' AAGCTCCGTCAACCACTCTG

**Tabla 3.4. Secuencia de cebadores utilizados para PCR en tiempo real.** Fw: sentido Rv: antisentido.

### 3.7 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS

Para la preparación de los extractos proteicos, el pellet de trofozoítos se resuspendió en 50  $\mu$ L de PBS-Tritón 1 % y se incubó en hielo durante 1 h. El homogenato se centrifugó a 13000 x *g* durante 15 minutos y se recuperó el sobrenadante.

La concentración de proteínas solubles se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando como patrón una curva de calibración con albúmina sérica bovina cuya concentración fue determinada espectrofotométricamente a 280 nm.

### 3.8 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE)

La separación electroforética de las muestras proteicas fue llevada a cabo en condiciones desnaturalizantes y reductoras según el sistema discontinuo de Laemmli (Laemmli, 1970). Se utilizaron geles de concentración de poliacrilamida al 5% [en 0,13 M Tris-HCl pH 6,8; 0.1% p/v de dodecilsulfato sódico (SDS)] y geles de separación de poliacrilamida al

12% (en 0,36 M Tris-HCl pH 8,8; 0,1 % p/v SDS). Las muestras se prepararon incubando los extractos proteicos (10 µg) durante 10 min a 95°C en solución de siembra (SAM: Tris-HCl 0,5 M pH= 6,8; SDS 10%; azul de Bromofenol 0,5% y glicerol) y en presencia de β-mercaptoetanol 5 mM. Los geles se armaron en el sistema Mini-PROTEAN III (Bio-Rad Laboratories). Para la corrida electroforética se utilizó una solución conteniendo 25 mM Tris-HCl pH 8; 1,44 % p/v glicina y 0,05 % p/v SDS, y se aplicó una intensidad de corriente constante de 200 V por gel. Además de las muestras proteicas de interés, se agregó a los geles el marcador de peso molecular comercial *Precision Plus Protein Standards (Biorad)* que permite la visualización de proteínas de los siguientes pesos moleculares: 250; 150; 100; 75; 50; 37; 25; 20; 15 y 10 kDa.

### 3.9 ENSAYOS DE INMUNODETECCIÓN

#### 3.9.1. Inmunodetección de proteínas mediante la técnica de *Western blot*

Los extractos proteicos se sometieron a separación mediante SDS-PAGE y luego se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Hybond™ ECL™, Little Chalfont, UK). La transferencia se realizó por aplicación de una corriente constante de 270 mA durante 2,30 hs a temperatura ambiente (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad), en presencia de buffer de transferencia (Tris 20 mM, glicina 150 mM y metanol al 20%) (Towbin et al., 1979).

Luego de la electrotransferencia, la membrana se bloqueó durante 1 h en agitación a temperatura ambiente en una solución de 5% p/v de leche en polvo con bajo contenido graso (Molico, Nestlé®), preparada en buffer TBS (del inglés *Tris Buffered Saline*) (solución amortiguadora de Tris-salino: 25 mM Tris; 150 mM NaCl), para evitar la posterior unión inespecífica de anticuerpos. Posteriormente, la membrana se incubó durante 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente a la proteína de interés (**Tabla 3.3**). La membrana se lavó consecutivamente 3 veces con TBS suplementado con *Tween 20* (TBS-Tween 20 al 0.1%) por 15 min y luego se incubó con el anticuerpo secundario marcado con la enzima peroxidasa de rábano o *HRP* (del inglés *Horseradish Peroxidase*). Una vez finalizada la incubación, la membrana se lavó 3 veces con TBS-Tween 20 al 0,1%. Las proteínas se visualizaron por autorradiografía con el sustrato *quimioluminiscente SuperSignal West Pico* (Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, US.). Brevemente, 24 µL de luminol 1,25 mM y 4 µL de ácido cumárico 200 µM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US) fueron agregados al buffer Tris-HCl 100 mM pH 8,6 e, inmediatamente

antes de incorporar a la membrana, se añadieron 3  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrógeno al 30% v/v. Después de 1 min de incubación en oscuridad, la membrana escurrida fue cubierta con una lámina de plástico y una película de fotografía *Agfa Ortho CP-G Plus* (AGFA) fue expuesta por 2 min en un *cassette* para autoradiografía. Finalmente, la película fue revelada entre 3 a 5 min hasta la aparición de bandas, fijada y lavada con agua. Los controles incluyeron la omisión del anticuerpo primario, el uso de un anticuerpo no relacionado, y, en algunos casos, ensayos con células no transfectadas

### 3.9.2 Inmunodetección de proteínas mediante la técnica de inmunofluorescencia (IF)

Los trofozoítos se lavaron con PBSm (PBS + medio de crecimiento al 1%, pH 7,4) y se colocaron sobre un portaobjeto, previamente tratado con poli-L-lisina, para permitir la adherencia de las células. Los portaobjetos se incubaron a 37°C, en cámara húmeda y, luego de la fijación con formaldehído al 4% durante 40 min a temperatura ambiente, las células se lavaron y se bloquearon con PBS conteniendo 10% de suero normal de cabra (Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, CA, US) y Triton X-100 al 0,1%. A continuación, las células fueron incubadas con anticuerpos específicos diluidos en solución de anticuerpo (PBS conteniendo 3% de suero normal de cabra y Tritón-X100 al 0,1%) por 1 h. Las preparaciones se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra anti-ratón) conjugado a Alexa 488 en solución de anticuerpo (**Tabla 3.3**). Por último, las preparaciones se lavaron y se montaron en medio de montaje FluorSave™ (Merck, Kenilworth, NJ, USA). La marcación fluorescente se visualizó a través de un microscopio confocal Olympus FV800 motorizado (Olympus UK Ltd, Reino Unido), utilizando objetivos de inmersión en aceite (NA 1,32) 63X o 100X. Los fluorocromos se excitaron usando un láser de argón a 488 nm. El compuesto diamidino-2-phenylindole (DAPI) se visualizó mediante excitación con luz ultravioleta utilizando un láser de argón 364 nm. Las hendiduras de detección fueron configuradas para reducir al mínimo cualquier cruce de señal entre los canales. Finalmente, las imágenes fueron procesadas utilizando los programas ImageJ y Adobe Photoshop 8.0 (Adobe Systems)

Anticuerpo	Procedencia	Dilución	Casa comercial
Anti-HA	Monoclonal de ratón	1:1250	Sigma (St Louis, MO, US)
AlexaFluor-488	Monoclonal de ratón	1:500	Molecular Probes, Eugene, Oregon, US
Anti-14-3-3	Policlonal de conejo	1:10000	Generado en el laboratorio de Marco Lalle
Anti-PDI2	Policlonal de ratón	1:2000	Generado en el laboratorio de Marco Lalle
Anti-EF1	Policlonal de ratón	1:2000	Generado en el laboratorio de Marco Lalle
Anti-Tubulina	Policlonal de ratón	1:10000	Sigma (St Louis, MO, US)
Anti-Actina	Policlonal de conejo	1:2000	Generado en el laboratorio de Alexander Paredez
Anti-HRP	Policlonal de ratón	1:5000	DakoCytomation
Anti-HRP	Policlonal de conejo	1:1000	Zymed

**Tabla 3.3. Anticuerpos utilizados en ensayos de inmunodetección.**

### 3.10 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Para preservar la organización celular, los trofozoítos salvajes *WB/1267* y los transgénicos *glvps4a-ha*, *as-glvps4a*, *glvps4a<sub>E228Q</sub>-ha*, *glrab11-ha* y *ds-grab11*, se fijaron *in situ* usando 2,5% de glutaraldehído y 4% de formaldehído en solución amortiguadora de cacodilato de sodio 0,1 M, pH 7,2. Luego, las células se rasparon de la pared del tubo con espátula de goma, se lavaron en la solución amortiguadora de cacodilato de sodio 0,1 M, pH 7,2 y se fijaron nuevamente por 60 min a 4°C con una solución que contenía tetróxido de osmio al 1% y ferrocianuro de potasio al 0,8% en solución amortiguadora de cacodilato de sodio 0,1 M, pH 7,2. Posteriormente, las células se lavaron utilizando la misma solución amortiguadora, se deshidrataron en soluciones de acetona de concentraciones crecientes y se incluyeron en resina Epon. Las secciones finas se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Finalmente, se observaron en un microscopio electrónico Zeiss 109. Todas las imágenes de EM disponibles fueron cuantificadas. Este experimento se realizó en colaboración con la Dra. Adriana Lanfredi-Rangel (Unidade de Microscopia Eletrônica, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Salvador, Bahía, Brasil).

# Resultados

# PARTE I

Caracterización de las vesículas extracelulares de dos cepas con diferente patogenicidad de *Giardia lamblia*

## 4. RESULTADOS

### **PARTE I: Caracterización de las vesículas extracelulares de dos cepas con diferente patogenicidad de *Giardia lamblia***

Se ha descrito, que la capacidad funcional que poseen las VEs está ligada a los receptores que poseen en su membrana y al cargo contenido en su interior. Los principales componentes de las VEs incluyen proteínas, material genético y lípidos que la célula de origen ha seleccionado para luego liberar al medio extracelular, siendo las proteínas el subconjunto más ampliamente estudiado (Tkach and Thery, 2016).

La identificación de proteínas celulares que forman parte de las VEs se ha realizado mediante diversas técnicas como ensayos de inmunotransferencia o citometría de flujo. Sin embargo, en la actualidad los estudios de espectrometría de masa son los que han permitido identificar otras proteínas que no habían sido descritas anteriormente como componentes de las VEs (Rosa-Fernandes et al., 2017). Estos estudios se han llevado a cabo en MVs y exosomas de diferentes organismos, incluyendo parásitos, en los cuáles se ha observado que muchas de las proteínas que son secretadas a través de los diferentes tipos de VEs pueden actuar como factores de virulencia; siendo necesarias para la adaptación al ambiente y, en el caso de microorganismos patógenos, la adaptación al hospedador. Además, los factores de virulencia están involucrados en diferentes procesos vitales incluyendo la formación de biofilms, la invasión tisular, la evasión de la respuesta inmune y la adquisición de nutrientes (Ortega-Pierres and Arguello-Garcia, 2019).

Diplomonadidas es un grupo de protistas flagelados con dos núcleos que involucra a especies parasitarias y de vida libre. Las diplomonadidas parásitas a menudo se encuentran en el tracto digestivo de mamíferos, aves y peces, donde algunas son patógenas (Roxstrom-Lindquist et al., 2010). *G. lamblia*, que es la más estudiada del grupo, es un importante patógeno zoonótico de transmisión ambiental. Debido a la diversidad de hospedadores que infecta el parásito, fue necesario clasificarla en ocho ensamblajes o conjuntos distintos (es decir, subtipos genéticos) designados de la A a la H (Caccio et al., 2018; Feng and Xiao, 2011), demostrándose por estudios moleculares que la mayoría de los genotipos presentaban diferentes preferencias por los hospedadores (**Tabla 4.1**) (Monis et al., 2003; Thompson et al., 2000).

Grupo	Hospedadores
A	Humanos, Perros, Gatos, Ovinos, Porcinos, Chinchillas, Bovinos, Caballos, Castores, Alpaca
B	Humanos, Perros, Ratas, Ratones, Chinchillas, Castores
C	Perros
D	Perros
E	Bovinos, Porcinos, Ovinos
F	Gatos
G	Ratas
H	Focas, gaviotas

**Tabla 4.1** Grupos genéticos de *G. lamblia* y sus hospedadores.

Los humanos pueden ser infectados con parásitos que pertenecen solo a los ensamblajes A y B (Thompson and Monis, 2004), de los cuales los aislados WB/C6 (ensamblaje A) y GS/H7 (ensamblaje B) son los que se encuentran más ampliamente estudiados y sus genomas han sido secuenciados y reportados (Franzen et al., 2009; Jerlstrom-Hultqvist et al., 2010; Morrison et al., 2007). Cuando se realizó la genómica comparativa entre ambos ensamblajes, la misma mostró que ambos son diferentes en un 23% a nivel de nucleótidos y un 22% a nivel de aminoácidos (Franzen et al., 2009) y estas diferencias se han propuesto para explicar las variaciones en la tasa de crecimiento, la infectividad y la patogenicidad (Caccio et al., 2018). Por ejemplo, el aislado GS/H7 crece más lentamente en cultivos axénicos (Karaniš and Ey, 1998), y es el único aislado capaz de infectar ratones adultos sin pre-tratamiento con antibióticos (Byrd et al., 1994). En los jerbos de Mongolia, los parásitos del ensamblaje B (GS/H7) inducen un acortamiento de las células epiteliales, infiltración de un mayor número de células inflamatorias en el duodeno y el yeyuno y, además, provocan el ablandamiento constante de las heces (Benere et al., 2012). *In vitro*, las proteínas secretoras de la cepa GS/H7 produjeron respuestas inflamatorias más fuertes en las células epiteliales intestinales o IEC (del inglés *Intestinal Epithelial Cells*) humanas (HT-29), presentando producción de interleuquinas 8 y 1-beta, así como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF) - $\alpha$  (Lee et al., 2012).

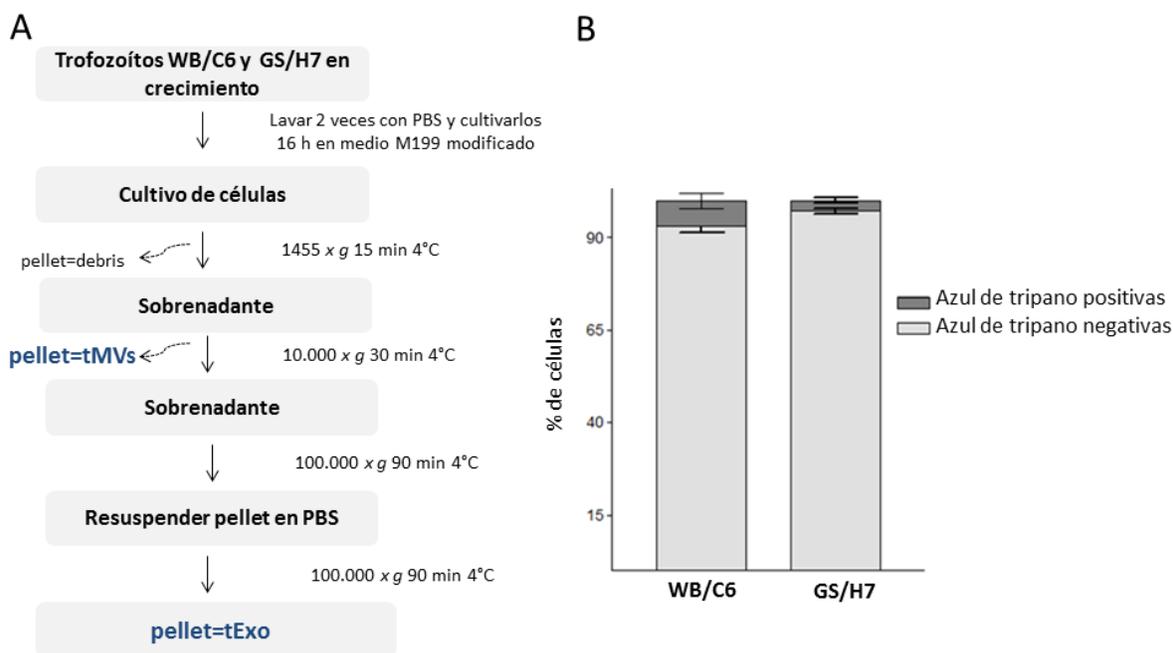
En conjunto, estos antecedentes ponen de manifiesto que existen diferencias en la infectividad y patogenicidad entre los ensamblajes A y B y que podrían estar dadas por una diferencia a nivel de nucleótidos y aminoácidos. Considerando además que las VEs tienen la capacidad de poder secretar proteínas que actúan como factores de virulencia, nos propusimos estudiar en este trabajo de tesis si además esas diferencias podrían estar dadas por una disparidad en el contenido de proteínas presentes en las VEs.

#### 4.1.1 Los ensamblajes A y B de *Giardia lamblia* liberan al medio extracelular vesículas del tipo microvesículas y exosomas

Uno de los pasos principales que se realizan para poder estudiar las VEs, es el aislamiento de las mismas, para luego poder caracterizarlas y estudiar en más detalle a sus cargos. El aislamiento de las VEs es un paso crítico debido a que los métodos de aislamiento son actualmente muy diversos y, dependiendo de cuál es el método utilizado, los resultados pueden ser considerablemente distintos, aun partiendo de la misma muestra.

Actualmente, se han publicado varios métodos para purificar y caracterizar VEs de diferentes tipos celulares, las cuales incluyen técnicas muy diversas como centrifugación, cromatografía, filtración, precipitación basada en polímeros y separación inmunológica (Li et al., 2017). Para poder analizar el contenido total de proteínas presentes en las VEs de las diferentes cepas de *G. lamblia*, realizamos una adaptación de un método clásico para purificar tMVs y tExo basado en la ultracentrifugación diferencial, modificando el medio de cultivo para evitar la contaminación con VEs provenientes de otras fuentes tales como el suero adulto bovino (BSA) y bilis bovina y así no obtener proteínas contaminantes en análisis posteriores. Para ello, trofozoítos en monocapa de *G. lamblia* WB/C6 (ensamblaje A) y trofozoítos de *G. lamblia* GS/H7 (ensamblaje B) crecidos en el medio TSY-I-33, se lavaron con PBS y luego se incubaron durante 16 hs con medio M199 modificado. Transcurridas las 16 hs, las diferentes poblaciones de VEs se sedimentaron del medio mediante ultracentrifugaciones a diferentes velocidades (**Figura 4.1 A**).

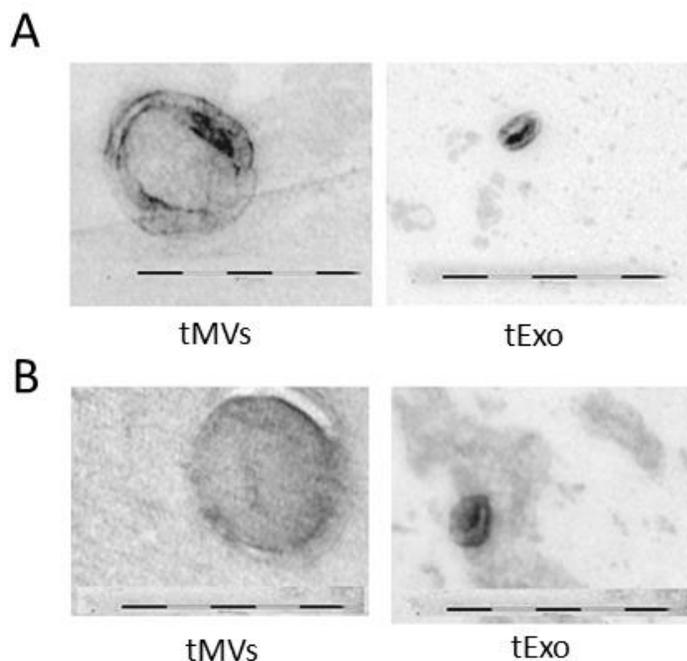
Para analizar si los parásitos tenían la capacidad de sobrevivir en el medio M199 por 16 hs, se realizó un ensayo de viabilidad con el colorante vital azul de tripano, y se procedió a contar los parásitos vivos. En este ensayo, parásitos muertos incorporan el colorante y muestran un color azul bajo el microscopio ya que el colorante es capaz de atravesar la membrana alterada. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 4.1 B**, donde es posible observar un bajo porcentaje de células muertas en ambos ensamblajes.



**Figura 4.1. Aislamiento de VEs. (A)** Procedimiento para el aislamiento de tMV y tExo derivados de *G. lamblia*. **(B)** Ensayos de viabilidad de parásitos: el recuento celular se realizó usando azul de tripano para ambas cepas.

Uno de los métodos más utilizados para corroborar el aislamiento selectivo de las diferentes poblaciones de vesículas es MET, siendo una técnica de gran utilidad para la observación de las VEs al finalizar el procedimiento. Así, las fracciones obtenidas a partir del medio M199 modificado, se observaron al microscopio electrónico, revelando estructuras vesiculares de doble membrana con tamaños heterogéneos. En ambos ensamblajes (WB/C6 y GS/H7), se observó que la fracción enriquecida en tMV presentaba mayoritariamente vesículas de tamaños entre 100-1000 nm, mientras que en la fracción tExo, las vesículas obtenidas presentaban forma de copa y tamaños de  $\approx 70$  nm (**Figura 4.2**). Estos resultados

sugieren que ambos tipos celulares poseen la capacidad de secretar al medio extracelular vesículas de diferentes tamaños y características.



**Figura 4.2. *G. lamblia* libera diferentes tipos de VEs.** Las vesículas aisladas se contrastaron con acetato de uranilo y se observaron por MET. **A)** VEs de la cepa WB/C6: en el panel izquierdo se muestra una tMVs de  $\approx 150$  nm, mientras que en el panel derecho se muestra una vesícula de la fracción tExo, con forma de copa, con un tamaño de  $\approx 70$  nm. **B)** VEs de la cepa GS/H7: en el panel izquierdo se muestra una tMVs  $\approx 150$  nm, mientras que en el panel derecho se muestra una vesícula tExo con forma de copa con un tamaño de  $\approx 70$  nm. Barra de escala: 200 nm.

#### 4.1.2 Las vesículas extracelulares de *Giardia lamblia* seleccionan específicamente el contenido proteico

Los primeros estudios sobre las VEs sugerían que llevaban en su interior una mezcla azarosa de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos; pero a través del tiempo, se pudo afirmar que el contenido de las mismas no es aleatorio; sino que es el resultado de una selección específica y dirigida por varios mecanismos celulares (Colombo et al., 2014). Además, el contenido presente en cada VE le confiere características particulares que influyen en sus propiedades biológicas (Kalra et al., 2016; Pegtel et al., 2014; Tkach and Thery, 2016).

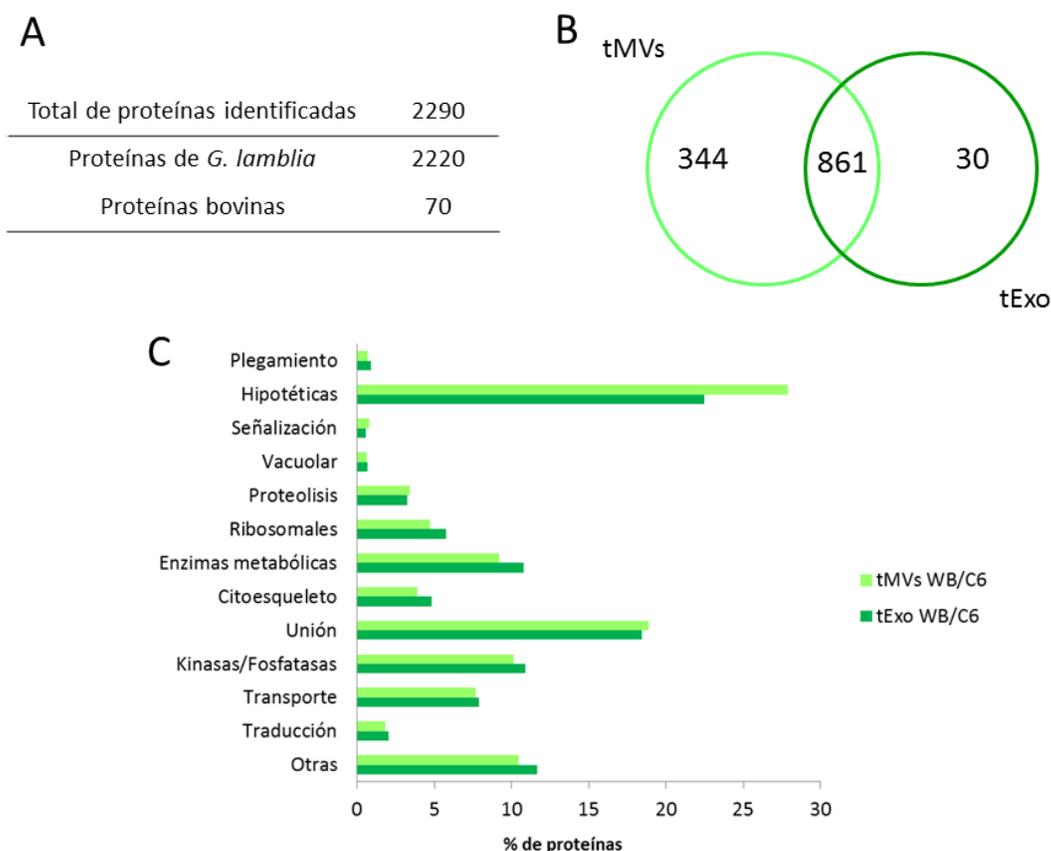
Como mencionamos anteriormente, una de las metodologías más utilizadas para caracterizar el contenido total de proteínas de las VEs es la espectrometría de masa. Actualmente, esta técnica se ha utilizado exitosamente para revelar el proteoma de VEs de

muchos organismos, incluyendo parásitos tales como *T. vaginalis* (Nievas et al., 2018; Twu et al., 2013), *T. gondii* (Rosa-Fernandes et al., 2017), *Leishmania donovani* (Silverman et al., 2010), entre otros, en los cuáles se ha demostrado que el contenido de proteínas presentes en las VEs se encuentra regulado. Para saber si en *G. lamblia* la incorporación de proteínas en las VEs es un proceso específico, realizamos un análisis proteómico y evaluamos las proteínas presentes en los diferentes tipos de VEs que son liberadas por el parásito.

#### 4.1.2.1 Análisis proteómico de vesículas extracelulares de la cepa WB/C6

Para realizar el estudio del contenido proteico de tMVs y tExo derivados de trofozoítos del ensamblaje A, los parásitos de la cepa WB/C6 se cultivaron hasta alcanzar la fase logarítmica y se procesaron según se indicó anteriormente (**Figura 4.1 A**). Las diferentes poblaciones de VEs fueron analizadas por espectrometría de masa (**ver M&M sección 3.1.4**) y, mediante el análisis proteómico cuantitativo, se pudo determinar las proteínas totales que estaban presentes tanto en la fracción de tMVs como la de tExo. Se identificaron un total de 2290 proteínas, de las cuales un 97% (2220 proteínas) eran proteínas pertenecientes a *G. lamblia* mientras que el 3% restante (70 proteínas) fueron proteínas contaminantes bovinas (**Figura 4.3 A**). Los datos crudos se limpiaron de contaminantes presentes y en los análisis posteriores solo se tuvieron en cuenta aquellas proteínas que fueron identificadas y cuantificadas en al menos dos de los triplicados. Se compararon los datos proteómicos obtenidos del proteoma de tMVs con el de tExo de la cepa WB/C6. Curiosamente, si bien existen un total de 861 proteínas en común, hay 344 proteínas que son específicas de tMVs mientras que 30 proteínas se encuentran exclusivamente en tExo (**Figura 4.3 B**), lo que indica que tanto las tMVs como los tExo pueden seleccionar específicamente proteínas que podrían tener funciones diferenciales. Posteriormente, debido a que el contenido proteico de las VEs aisladas fue muy diverso, las mismas se clasificaron en trece grupos, para poder relacionar en que procesos biológicos podrían estar implicados. Del total de 1205 proteínas presentes en tMVs, la clasificación arrojó la presencia de 8 proteínas de plegamiento (0,66%), 336 proteínas hipotéticas (27,88%), 9 proteínas de señalización (0,75%), 7 proteínas de tipo vacuolar (0,58%), 41 proteínas relacionadas con la proteólisis (3,40%), 57 proteínas ribosomales (4,73%), 111 enzimas metabólicas (9,21%), 47 proteínas del citoesqueleto (3,90%), 227 proteínas de unión (18,84%), 122 kinasas y fosfatasa (10,12%), 92 proteínas relacionadas con el transporte (7,63%), 22 proteínas de traducción (1,83%) y 126 proteínas que no pertenecen a ningún grupo (otras) (10,46%), (**Figura 4.3 C**). Para el caso de los tExo, del total de 891

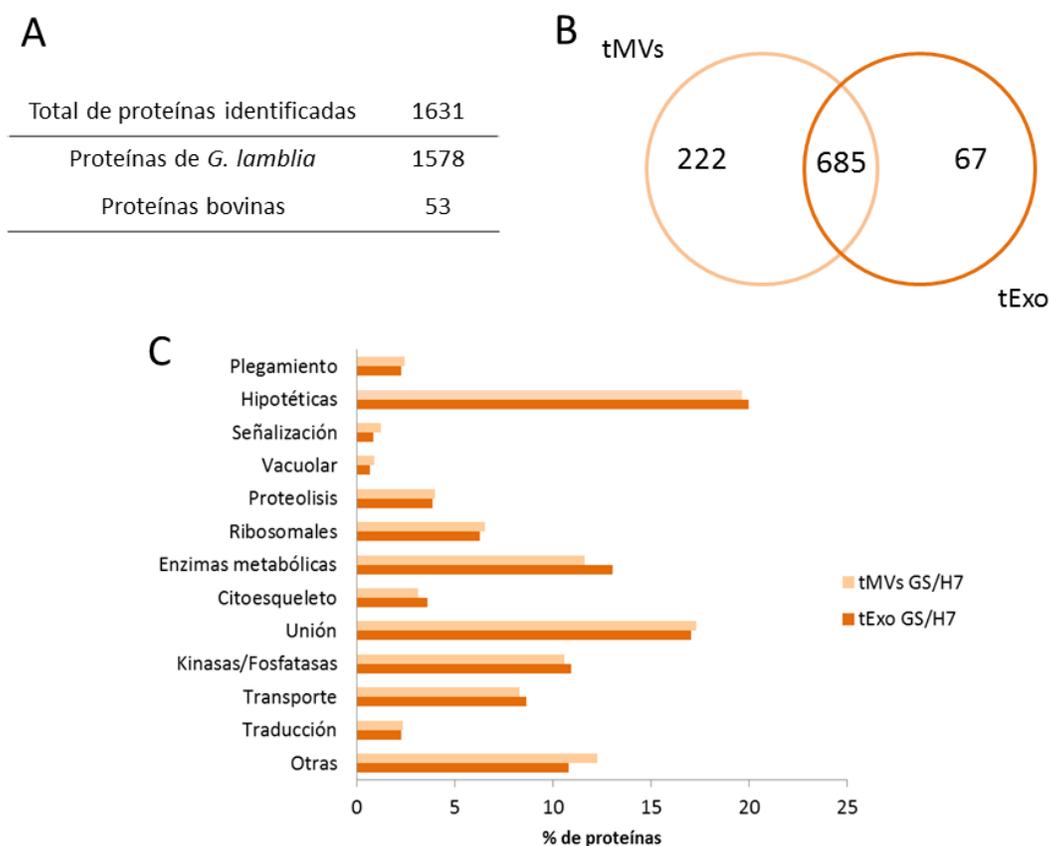
proteínas, se encontró que 8 proteínas eran de plegamiento (0,90%), 200 proteínas hipotéticas (22,45%), 5 proteínas de señalización (0,56%), 6 proteínas de tipo vacuolar (0,67%), 29 proteínas relacionadas con la proteólisis (3,25%), 51 proteínas ribosomales (5,72%), 96 enzimas metabólicas (10,77%), 43 proteínas del citoesqueleto (4,83%), 164 proteínas de unión (18,41%), 97 kinasas y fosfatasa (10,89%), 70 proteínas relacionadas con el transporte (7,86%) y 18 proteínas de traducción (2,02%) y 104 proteínas que no pertenecen a ningún grupo (otras) (11,67%) (**Figura 4.3 C**). En general, los resultados muestran que ambas poblaciones de vesículas contienen proteínas que se repiten en proteomas de MVs y exosomas de diferentes organismos, tales como enzimas metabólicas, elementos del citoesqueleto, factores de transcripción, proteínas integrales de membrana, entre otras, y además poseen proteínas específicas de *G. lamblia* como proteínas implicadas en el metabolismo y en la variación antigénica.



**Figura 4.3. Análisis del proteoma de tMV y tExo de *G. lamblia* (WB/C6).** (A) Número total de proteínas identificadas en el análisis proteómico. (B) Diagrama de Venn que representa las proteínas compartidas entre las tMV y tExo de *G. lamblia*. (C) Agrupación funcional de las proteínas identificadas en tMV y tExo. Mediante el uso de anotaciones derivadas de la base de datos de *GiardiaDB*, las proteínas se han organizado en base a su función molecular. La cantidad de proteínas fue normalizada con el número de proteínas totales.

#### 4.1.2.2 Análisis proteómico de vesículas extracelulares de la cepa GS/H7

Utilizando la misma estrategia que la utilizada para evaluar el contenido proteico de las VEs del ensamblaje WB/C6, se realizó espectrometría de masa de tMVs, tExo y pellet celular proveniente del ensamblaje GS/H7. En el análisis se identificaron en total 1631 proteínas, 1578 fueron proteínas pertenecientes a *G. lamblia* mientras que solamente 53 fueron contaminantes de bovino (3.25%) (**Figura 4.5 A**). Se realizó una comparación entre las proteínas presentes en tMVs y tExo, teniendo en cuenta solo aquellas proteínas que fueron identificadas y cuantificadas en al menos dos de los triplicados. Se halló 222 proteínas específicas de tMVs, 67 fueron específicas de tExo mientras que 685 se superponen entre las dos poblaciones de VEs (**Figura 4.5 B**). Las proteínas encontradas en las VEs se clasificaron de acuerdo a las funciones biológicas con las cual estaban relacionadas (**Figura 4.5**). Se puede observar que en el caso de las tMVs hay 22 proteínas de plegamiento (2,43%), 178 proteínas hipotéticas (19,63%), 11 proteínas de señalización (1,21%), 8 proteínas de tipo vacuolar (0,88%), 36 proteínas relacionadas con la proteólisis (3,97%), 59 proteínas ribosomales (6,50%), 105 enzimas metabólicas (11,58%), 28 proteínas del citoesqueleto (3,09%), 157 proteínas de unión (17,31%), 96 kinasas y fosfatasa (10,58%), 75 proteínas relacionadas con el transporte (8,27%), 21 proteínas de traducción (2,32%) y 111 proteínas que no pertenecen a ningún grupo (otras) (12,24%) (**Figura 4.5 C**). Para el caso de tExo, del total de 752 proteínas, se encontró que 17 proteínas eran de plegamiento (2,26%), 150 proteínas hipotéticas (19,95%), 6 proteínas de señalización (0,80%), 5 proteínas de tipo vacuolar (0,66%), 29 proteínas relacionadas con la proteólisis (3,86%), 47 proteínas ribosomales (6,25%), 98 enzimas metabólicas (13,03%), 27 proteínas del citoesqueleto (3,59%), 128 proteínas de unión (17,02%), 82 kinasas y fosfatasa (10,90%), 65 proteínas relacionadas con el transporte (8,64%), 17 proteínas de traducción (2,26%) y 81 proteínas que no pertenecen a ningún grupo (otras) (10,77%) (**Figura 4.5 C**).



**Figura 4.4. Análisis del proteoma de tMV y tExo de *G. lamblia* (GS/H7).** (A) Número total de proteínas identificadas en el análisis proteómico. (B) Diagrama de Venn que representa las proteínas compartidas entre las tMV y tExo de *G. lamblia*. (C) Agrupación funcional de las proteínas identificadas en tMV y tExo. Mediante el uso de anotaciones derivadas de la base de *GiardiaDB*, las proteínas se han organizado en base a su función molecular. La cantidad de proteínas fue normalizada con el número de proteínas totales.

#### 4.1.3 Las vesículas extracelulares de *Giardia lamblia* liberan proteínas que carecen de péptido señal

*G. lamblia* posee un sistema de endomembranas simple que carece de un verdadero aparato de Golgi, peroxisomas y de un sistema endosomal/lisosomal típico de células de mamíferos o levaduras (Ankarklev et al., 2010), por lo que la secreción de proteínas, su clasificación y el tráfico siguen siendo un aspecto desconcertante de la biología del parásito. Existen proteínas presentes en *G. lamblia* que carecen de péptido señal pero que son secretadas al medio extracelular por el parásito, esto sugiere la presencia de mecanismos secretores no convencionales.

Existe evidencia que muestra que proteínas carentes de péptido señal pueden ser secretadas en VEs proveniente de diferentes tipos celulares, incluyendo a parásitos protozoarios (Marcilla et al., 2014). Cuando se analizó el porcentaje de proteínas secretadas que poseían péptido señal en ambos ensamblajes, se observó, en el caso del ensamblaje A que del total de 1235 proteínas solo 117 poseen péptido señal (~9,50%, **Tabla 4.2**). Por otro lado, para el ensamblaje B, de las 974 proteínas que son secretadas, se detectaron que 88 poseían péptido señal (~9,03 %, **Tabla 4.2**). La detección de un porcentaje relativamente pequeño de proteínas con péptido señal en las VEs de *G. lamblia* sugiere que en el parásito existe la presencia de VEs como vías alternativas de secreción de proteínas que carecen de péptido señal.

Ensamblaje	% proteínas con péptido señal
A (WB/C6)	9,50
B (GS/H7)	9,03

**Tabla 4.2. Tabla de porcentaje de proteínas con péptido señal según se indica en *GiardiaDB***

4.1.4 Las vesículas extracelulares de los ensamblajes A y B poseen proteínas típicas de vesículas extracelulares y otras particulares del parásito

El análisis proteómico reveló que proteínas pertenecientes a los grupos de plegamiento, hipotéticas, señalización, vacuolar, proteólisis, ribosomales, metabólicas, citoesqueleto, unión, kinasas y fosfatasas, transporte, de traducción y otras, se identificaron en ambas poblaciones de VEs y en ambos ensamblajes con algunas diferencias (**Figura 4.5**). Se observó que tanto en tMV como en tExo, las proteínas de plegamiento, de señalización, de proteólisis, ribosomales, metabólicas, proteínas de transporte y de traducción, son más abundantes en el ensamblaje B (GS/H7), mientras que las proteínas hipotéticas, de unión y del citoesqueleto son más abundantes en el ensamblaje A (**Figura 4.5**). En contraste, existen variaciones entre las tMV y tExo en las proteínas vacuolares, kinasas/fosfatasas y proteínas, que no fueron agrupadas en ninguna categoría (**Figura 4.5**).

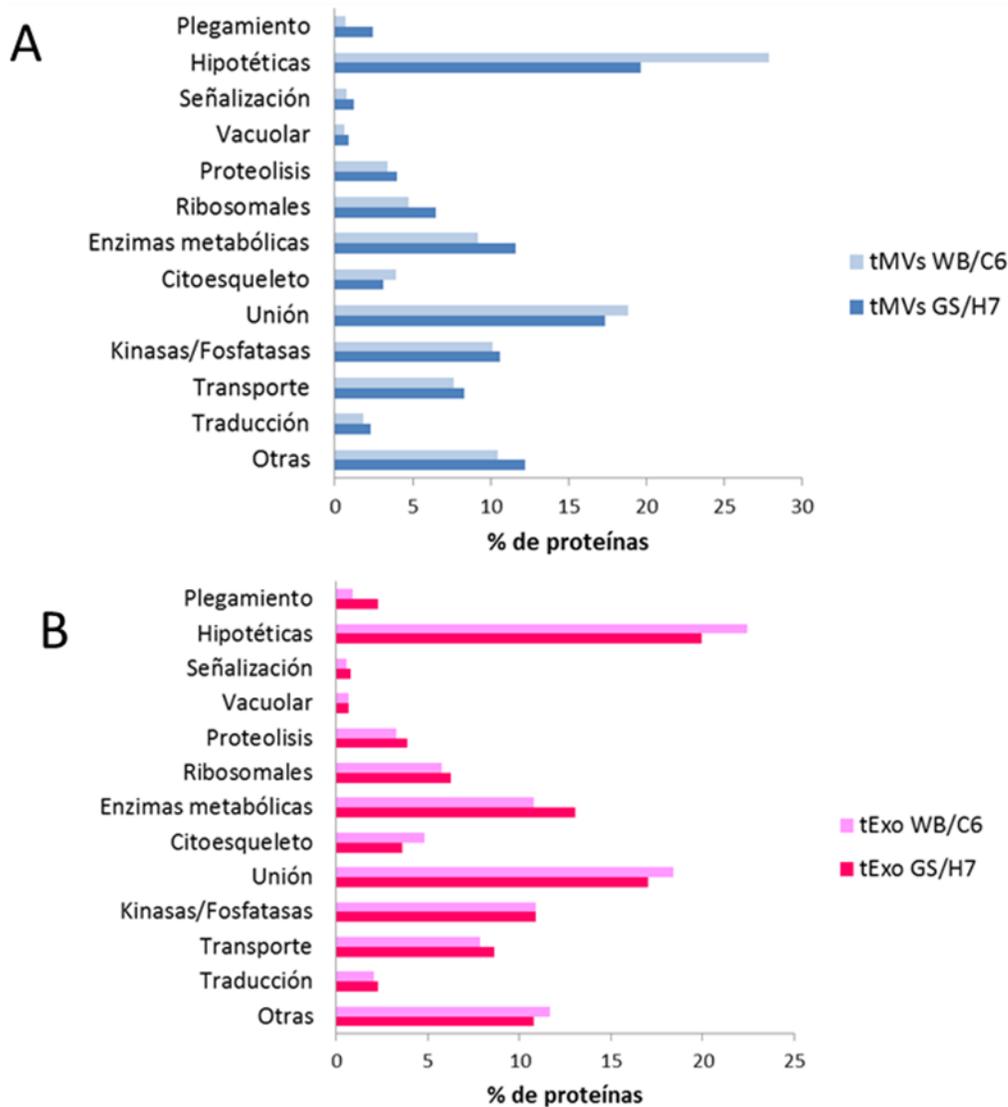
Cuando se analizó en más detalle, se observó que proteínas hipotéticas, proteínas de unión y enzimas metabólicas fueron los grupos más abundantes presentes en ambos tipos de vesículas. Con respecto al gran porcentaje de proteínas hipotéticas no fue llamativo ya que ambos genomas poseen un gran número de genes que codifican para proteínas que presentan

muy baja similitud de secuencia con proteínas de otras especies. El segundo grupo de proteínas más abundantes corresponde a las proteínas de unión, las cuales incluyen principalmente proteínas de unión a ARN, lípidos y calcio. Y por último, dentro de las enzimas metabólicas, observamos la presencia de proteínas que tienen funciones asociadas a procesos metabólicos y catabólicos de aminoácidos, metabolismo de monosacáridos, glucólisis y enzimas relacionados con la generación de precursores, metabolitos y energía. Además, se identificaron proteínas con otras funciones metabólicas, como la del metabolismo de la arginina. Por otro lado, se observó la presencia de proteínas implicadas en el metabolismo lipídico, las cuales incluyen enzimas involucradas en la remodelación y recuperación de ácidos grasos y de fosfolípidos como la fosfolipasa B. Aunque se ha demostrado que las células pueden intercambiar enzimas metabólicas a través de VEs, todavía queda mucho por dilucidar con respecto a su actividad metabólica intrínseca (**Figura 4.5 y Anexo I**).

En menor medida, se identificaron proteínas ribosomales, kinasas/fosfatasa, proteínas de transporte y relacionadas con eventos de fusión de membranas, tales como Rab y Ras, proteínas que pertenecen al citoesqueleto como actina, tubulina y dineína, proteínas implicadas con la señalización como 14-3-3 y GTPasas y proteínas de ensamblaje, principalmente proteínas de choque térmico o HSPs (del inglés *Heat-shock proteins*) (**Figura 4.5**). Estos resultados sugieren que los ensamblajes A y B de *G. lamblia* secretan VEs que son representativas ya que muchas de las proteínas que encontramos son proteínas comúnmente identificadas en estudios proteómicos de VEs de diferentes organismos (Nievas et al., 2018).

Por otro lado, el análisis proteómico reveló proteínas que son exclusivas del parásito y que se han informado previamente como proteínas inmunorreactivas durante la giardiasis humana (Palm et al., 2003). Estas proteínas incluyen a las proteínas variables de superficie o VSPs (del inglés *Variant-specific surface proteins*) y tenascinas. Las VSPs son, en su mayoría, proteínas de membrana tipo I y se expresan en la membrana plasmática de los trofozoítos de *G. lamblia* a través de un mecanismo regulado por ARNi (Prucca et al., 2008). Son factores de virulencia por excelencia y responsables de la variación antigénica. Dichas proteínas fueron detectadas en tMVs y tExo del ensamblaje A y B (19 y 5, respectivamente, **Anexo I**). Con respecto a las tenascinas, son componentes de la matriz extracelular y modulan además la adhesión celular y la migración (Chiquet-Ehrismann and Chiquet, 2003). De manera sorprendente, solo se encontraron tenascinas en el proteoma de tMVs y tExo del ensamblaje más patógeno correspondiente al ensamblaje B.

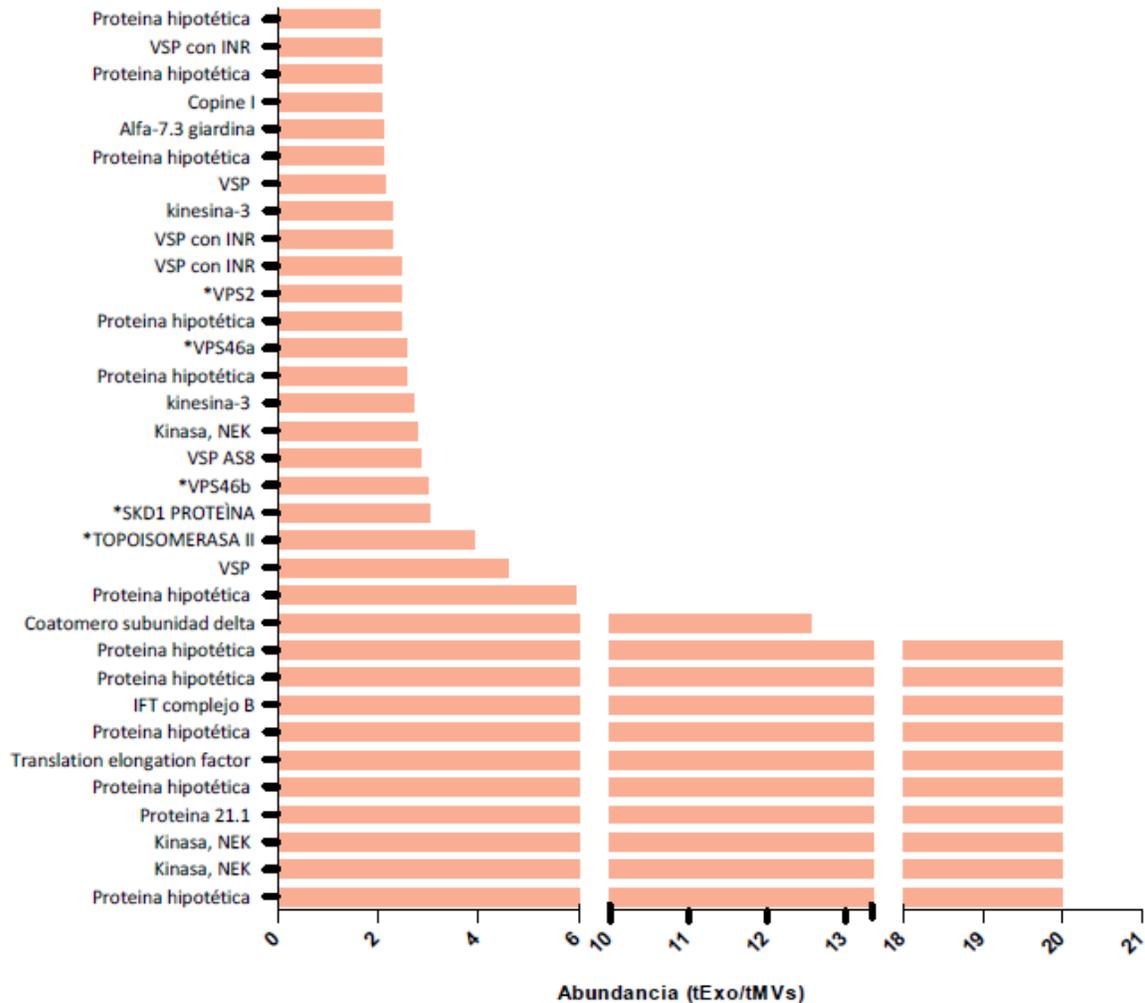
Podemos decir entonces que, mediante este análisis, hemos identificado proteínas que son secretadas por el parásito a través de las VEs. Nuestros resultados indican que las VEs de ambos ensamblajes poseen proteomas similares, pero existen algunas diferencias específicas que podrían explicar las diferencias observadas en la infectividad y los síntomas de la enfermedad.



**Figura 4.5. Análisis comparativo del proteoma de VEs entre el ensamblaje A (WB/C6) y ensamblaje B (GS/H7). (A)** Agrupación funcional de las proteínas identificadas en tMVs del ensamblaje A y B. **(B)** Agrupación funcional de las proteínas identificadas en tExo del ensamblaje A y B.

#### 4.1.5 Las vesículas tipo exosomas del ensamblaje A están enriquecidas en proteínas de la maquinaria ESCRT

Una de las características más distintivas que existe entre las MVs y los exosomas es su mecanismo de formación. Las primeras se forman por evaginación de la membrana citoplasmática y, por lo tanto, contienen mayoritariamente proteínas de membrana; mientras que los exosomas se forman en la vía endocítica y están enriquecidos con proteínas provenientes del sistema endosomal (Colombo et al., 2019). En este sentido, el análisis proteómico cuantitativo reveló que existe solo en tExo provenientes del ensamblaje A (WB/C6) un enriquecimiento de proteínas pertenecientes a la maquinaria ESCRT, tales como GIVps2 (GL50803\_29327), GIVps46a (GL50803\_15472), GIVps46b (GL50803\_24947), GIVps4a (proteína SKD1) (GL50803\_101906) y GIVps4b (topoisomerasa II) (GL50803\_16795) (**Figura 4.6**). Las proteínas de la maquinaria ESCRT están involucradas en el empaquetamiento de lípidos y proteínas ubiquitinadas en los MVBs y, además, en la formación de las ILVs en los endosomas tardíos, que luego se liberan como exosomas al exterior celular (They et al., 2019). Los resultados mencionados apuntan a un mecanismo diferenciado entre la formación de tMVVs y tExo en el ensamblaje A, sugiriendo que los tExo se formarían en organelas de naturaleza endo-lisosomal, probablemente en las PVs.



**Figura 4.6. Proteínas enriquecidas en tExo del ensamblaje A (WB/C6).** Proteína hipotética (GL50803\_103709), VSP con INR (GL50803\_112208), Proteína hipotética (GL50803\_7843), Copine I (GL50803\_8903), Alfa 7.3 giardina (GL50803\_114787), Proteína hipotética (GL50803\_8968), VSP (GL50803\_137612), Kinesina-3 (GL50803\_102101), VSP con INR (GL50803\_113797), VSP con INR (GL50803\_11470), Vps2 (GL50803\_29327), Proteína hipotética (GL50803\_29327), Vps46a (GL50803\_15472), Proteína hipotética (GL50803\_28962), Kinesina-3 (GL50803\_112846), Kinasa NEK (GL50803\_5346), VSP AS8 (GL50803\_13194), Vps46b (GL50803\_24947), SKD1 proteína (GL50803\_101906), Topoisomerasa II (GL50803\_16795), VSP (GL50803\_101765), Proteína hipotética (GL50803\_15472), Coatmero subunidad delta (GL50803\_6170), Proteína hipotética (GL50803\_11129), Proteína hipotética (GL50803\_24947), IFT complejo B (GL50803\_40995), Proteína hipotética (GL50803\_12830), Translation elongation factor (GL50803\_7990), Proteína hipotética (GL50803\_7328), Proteína 21.1 (GL50803\_6344), Kinasa NEK (GL50803\_14835), Kinasa NEK (GL50803\_12148), Proteína hipotética (GL50803\_137746). \*Se destacan las proteínas pertenecientes a la maquinaria ESCRT.

#### 4.1.6 Discusión

Se ha reportado que la mayoría de las células vivas liberan al medio extracelular diferentes compuestos y que, junto con las macromoléculas, son capaces de modular el medio extracelular donde se desarrollan, permitiéndoles además llevar a cabo diferentes procesos biológicos. Estos productos liberados por las células constituyen lo que se denomina secretoma y algunos de estos aparecen englobados por membranas lipídicas, formando VEs.

Las VEs están rodeadas por una bicapa lipídica y poseen en su interior ácidos nucleicos, lípidos y proteínas. Hoy en día se considera que estas vesículas actúan como mecanismo de comunicación entre células y como transportadores de información genética, además de poseer funciones relacionadas con la modulación celular e inmunológicas. Actualmente, las VEs han sido aisladas y caracterizadas de diferentes clases de patógenos, incluyendo parásitos protozoarios, y en los cuáles se ha estudiado el papel de las mismas en la fisiología, la adaptación al hospedador, la patogenicidad y la modulación de la respuesta inmune (Geiger et al., 2010; Grebaut et al., 2009; Silverman et al., 2008; Wong et al., 2011). Sin embargo, hasta la fecha, en el parásito protozoario *G. lamblia* solo se ha demostrado que trofozoítos perteneciente al ensamblaje A (WB/C6) liberan MVs; aunque el origen, el contenido y la forma en la que se liberan no han sido dilucidados (Evans-Osses et al., 2017).

En este trabajo de tesis, se han aislado y caracterizado las VEs secretadas por los ensamblajes A y B. Para la extracción de las mismas, fue necesaria la puesta a punto de un método nuevo de aislamiento que permitió aislar las dos poblaciones de vesículas en ausencia de proteínas contaminantes. Como se describió en otros trabajos, las proteínas provenientes del suero en el sobrenadante eran una preocupación (Skarin et al., 2011), ya que dichas proteínas séricas se unen a la superficie del parásito y se liberan continuamente, lo que interfiere con la caracterización del proteoma de las VEs de *G. lamblia*. Para superar este problema, los parásitos fueron lavados con PBS e incubados en el medio M199 modificado y luego se recolectaron mediante ultracentrifugaciones las diferentes poblaciones de VEs.

Los resultados obtenidos mediante MET mostraron la presencia de vesículas con un tamaño aproximado de 70 nm y forma de copa, las cuáles denominamos tExo y, por otro lado, observamos la presencia de vesículas rodeadas de una bica lipídica con un tamaño entre 100-1000 nm, las cuales denominamos tMVs. Luego, mediante ensayos de espectrometría de

masa se pudo caracterizar el proteoma de las mismas e identificar las proteínas presentes en cada una de las poblaciones.

El estudio proteómico realizado en este trabajo es el primero en reportar el proteoma de las VEs aisladas de *G. lamblia*. Un resultado relevante es que en ambos ensamblajes encontramos solamente un ~9% de proteínas que poseen péptido señal lo que sugiere que existe una vía de secreción clásica en el parásito aunque la mayoría de las proteínas secretadas carecen de péptido señal, lo que indicaría que dichas proteínas utilizan las VEs como vía de secreción al medio extracelular.

El mayor número de proteínas que se detectaron en ambas poblaciones de VEs y en ambos aislados son proteínas hipotéticas. Esto no fue llamativo ya que ambos genomas poseen un gran número de genes que codifican para proteínas que presentan muy baja similitud de secuencias con proteínas de otras especies, probablemente debido a que el parásito se separó del linaje eucariota temprano en la historia evolutiva. La función de estas proteínas es desconocida, por lo tanto se requiere análisis bioinformáticos y funcionales más amplios para poder definir en que procesos biológicos están implicadas.

El segundo grupo de proteínas más abundante que se encontró fueron las proteínas de unión, las cuáles incluyen proteínas de unión a ARN, lípidos y calcio. En la última década, uno de los principales interrogantes ha sido la capacidad de las VEs de transportar material genético de una célula a otra y, a través de ello, ejercer funciones reguladoras a distancia. Si bien, en este trabajo de tesis no hemos investigado la presencia de ácidos nucleicos en las VEs, hemos podido demostrar la presencia de proteínas de unión a ARN en las mismas. La presencia de estas proteínas en las VEs en ambos ensamblajes, sugiere que éste puede ser el caso para el direccionamiento de ARN a las vesículas, ya que existe evidencia que señala que las proteínas de unión al ARN podrían servir como actores claves al hacer complejos con el ARN presente en el citoplasma y transportarlo a las VEs durante la biogénesis de las mismas (Statello et al., 2018). Esta idea es muy alentadora y sería foco de estudios de regulación de ARN que escapa a los objetivos de esta tesis. De la misma manera, ocurre con las proteínas de unión a lípidos, que podrían transportar lípidos y de esa forma empaquetarlos en las VEs (Record et al., 2014). Con respecto a las proteínas de unión a calcio, una de las funciones que poseen es regular la cantidad de  $\text{Ca}^{+2}$  libre que está presente en el citosol de la célula (Profeta et al., 2019). Si bien la función de las mismas en las VEs no ha sido completamente estudiada,

se podría pensar que las VEs podrían funcionar como un mecanismo que las células poseen para regular la concentración de calcio.

Este análisis además reveló a las proteínas con funciones metabólicas como una respuesta secretora abundante. Proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, de la arginina, de lípidos y de ácidos nucleicos fueron detectadas. La liberación de enzimas glicolíticas se ha informado previamente en *G. lamblia* (Ringqvist et al., 2008) y en muchos parásitos (Gomez-Arreaza et al., 2014), incluyendo *T. vaginalis* (Kucknoor et al., 2007), *T. brucei* (Geiger et al., 2010) y *L. donovani* (Silverman et al., 2008), en los cuáles se los ha asociado con la virulencia. Dentro de las proteínas implicadas en el metabolismo lipídico destacamos la presencia de la fosfolipasa B en ambas poblaciones de VEs y en ambos ensamblajes. Se ha demostrado que en cepas virulentas de *Candida albicans*, la fosfolipasa B promueve el daño y la lisis de la célula hospedadora y, además, la eliminación de la fosfolipasa B atenúa la virulencia de *Candida* en modelos murinos (Ghannoum, 2000).

Por otro lado, el estudio proteómico mostró que las VEs contienen un subconjunto específico de proteínas celulares, como proteínas típicas de las PVs, de la membrana plasmática y del citosol, lo que resalta la especificidad de la formación de estas vesículas y nos permite sugerir que en *G. lamblia* el cargo de proteínas presentes en las VEs no es al azar. Además, están presentes en las VEs de *G. lamblia* proteínas que se encuentran en VEs de otras especies como proteínas del citoesqueleto, proteínas de síntesis y relacionadas con la transcripción, proteínas de transporte y relacionadas con eventos de fusión de membrana y la presencia de proteínas de señalización, lo que sugiere que ambos ensamblajes de *G. lamblia* tienen la capacidad de secretar VEs representativas. Además, se observó que las VEs del ensamblaje B (GS/H7) poseían una mayor proporción de proteínas de plegamiento las cuáles incluyen principalmente a las HSPs. Algunas proteínas que pertenecen a esta familia son inducidas en respuesta a múltiples eventos de estrés celular, mientras que otras se expresan constitutivamente. Si bien se creía que las HSPs realizan solo funciones intracelulares, existe evidencia que muestra la presencia extracelular de HSPs, detectándose HSPs en sueros y fluidos cerebrospinales en diversas afecciones patológicas (Reddy et al., 2018). Las HSPs extracelulares están implicadas en la comunicación célula-célula, la activación de las células inmunes y la promoción de respuestas antiinflamatorias y antiplaquetarias (Wyciszkievicz et al., 2019).

Por otra parte, observamos también la presencia de proteínas que son únicas del parásito, las cuáles clasificamos como “otras” y muchas de ellas son consideradas factores de virulencia en *G. lamblia*, lo que reafirma a las VEs como mecanismos implicados en la patogenia del parásito. Entre estas proteínas, destacamos a las VSPs, tenascinas y proteínas relacionadas con el metabolismo. Las VSPs son factores de virulencia por excelencia y son responsables además de la variación antigénica en el parásito. Las tenascinas son glicoproteínas y, a pesar de la falta de similitud real con las tenascinas humanas, la presencia de dominios similares a EGF sugiere la participación de estas proteínas en la interacción proteína-proteína, señalización celular y la adhesión (Balzar et al., 2001; Baron, 2003). Además, poseen la capacidad de unir lectinas (Aspberg et al., 1995; Aspberg et al., 1997), por lo que se ha sugerido previamente un papel para las tenascinas de *G. lamblia* en la inmunidad innata del hospedador (Emery et al., 2016). Por otra parte, enzimas del metabolismo energético fueron encontradas en VEs de ambos ensamblajes, como la ornitil carbamil transferasa (OCT) y arginina deiminasa (ADI), las cuales están involucradas en procesos como la adhesión a las células epiteliales y a la invasión y adquisición de nutrientes (Ortega-Pierres and Arguello-Garcia, 2019). El hecho de observar en el proteoma de las VEs proteínas relacionadas con la patogénesis y la variación antigénica del parásito es interesante ya que podría sugerir un rol clave de las mismas en el momento de establecer la infección.

Nuestro estudio muestra algunas diferencias entre el ensamblaje A y el B. Una de las más importantes es que proteínas del tipo tenascinas están presentes sólo en el proteoma de tMVs y tExo de parásitos pertenecientes al ensamblaje B. Debido a que estas proteínas son claves para disrumpir la función normal de las células epiteliales entéricas, se podría pensar que esta distinción podría ser una causa de la diferencia de patogenicidad que existe entre ambos ensamblajes. Por otro lado, la ausencia de componentes ESCRT en las tExo del ensamblaje B, apunta a un mecanismo diferente de formación de ILVs y exosomas en este ensamblaje. Esto fortalece datos recientes que sugieren que los ensamblajes A y B podrían ser dos especies diferentes de *Giardia spp* (Franzen et al., 2009).

El presente estudio muestra un nuevo aspecto de la biología del parásito protozoario *G. lamblia*. Aunque existan aun muchos desafíos que enfrentar respecto al estudio de las VEs en *G. lamblia*, la detección de proteínas claves para la sobrevivencia y la patogenia del parásito son interesantes ya que pueden ayudar a comprender mejor el mecanismo de la enfermedad.

## PARTE II

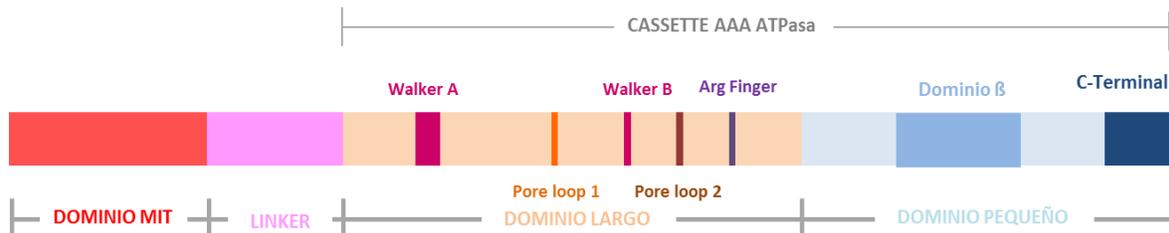
Rol de GlVps4a y GlRab11 en la formación y liberación de vesículas tipo exosomas en *Giardia lamblia*

## **PARTE II: Rol de GIVps4a y GIRab11 en la formación y liberación de vesículas tipo exomas en *Giardia lamblia*.**

La liberación de exomas es un proceso altamente conservado y regulado, aún entre organismos tan diferentes como humanos, *Drosophila*, *Arabidopsis*, levaduras y parásitos como *T. brucei*. Sin embargo, existen diferencias en cuanto al mecanismo por el cuál estos se forman y liberan. En la sección anterior hemos descrito que el parásito *G. lamblia* posee la capacidad de formar y liberar al medio extracelular vesículas de diferentes tamaños, las cuáles denominamos como tMVs y tExo, teniendo en cuenta su forma, tamaño y contenido proteico. Además, se demostró que las tExo del ensamblaje A están enriquecidas en proteínas ESCRT que podrían participar en la formación y/o liberación de exomas. Teniendo en cuenta esto como punto de partida es que investigamos cuáles son los mecanismos involucrados en la formación y liberación de tExo en trofozoítos de *G. lamblia* WB.

Como mencionamos anteriormente, ESCRT es un complejo esencial para la formación de ILVs en algunos tipos celulares (Hurley, 2015). Dentro de este complejo, la proteína AAA-ATPasa Vps4 es una proteína clave para ejecutar la reacción de abscisión de membrana para poder formar las ILVs (Babst et al., 2011). Vps4 es una ATPasa soluble que es reclutada y utiliza la energía de la hidrólisis del ATP (Babst et al., 1997; Babst et al., 1998). Esta proteína se encuentra conservada en todos los eucariotas y algunas especies tienen más de un parálogo (Scheuring et al., 2001). Vps4 presenta en su secuencia un dominio N-terminal que es un dominio MIT (del inglés *Microtubule Interacting and Trafficking*) de tres hélices que se une a secuencias MIM (del inglés *Interacting Motif*), ubicadas en las regiones C-terminales de las subunidades ESCRT-III (Kieffer et al., 2008; Scott et al., 2005b). El *cassette* ATPasa de la proteína Vps4 comprende un dominio ATPasa grande y otro pequeño (**Figura 4.7**). El dominio grande contiene los motivos Walker A y B, que impulsan la unión al ATP y la hidrólisis, respectivamente, así como bucles de poros que se unen al sustrato en el poro central del hexámero (Scott et al., 2005a). El dominio ATPasa pequeño, que sigue al dominio ATPasa grande, comprende cuatro hélices, y es seguido por una hélice C-terminal que se empaqueta contra el dominio grande. El dominio  $\beta$  emana de un bucle interno del pequeño dominio ATPasa para mediar las interacciones con la proteína cofactor Vta1 / LIP5 (Scott et al., 2005a; Yang and Hurley, 2010). Vta1 / LIP5 se une y estabiliza el complejo ensamblado Vps4 a través de su dominio dimérico, VSL C-terminal (Vta1-SBP1-LIP5)(Xiao et al., 2008) y también muestra

dominios MIT N-terminal conectados de forma flexible que pueden mejorar aún más la asociación con los filamentos ESCRT-III (Xiao et al., 2008).



**Figura. 4.7. Estructura del dominio de Vps4a.** Secuencia lineal de Vps4 eucariota con dominios y motivos indicados.

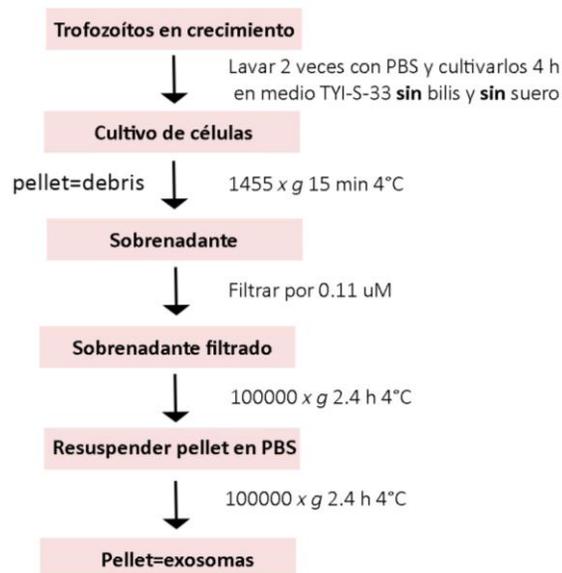
Por otro lado, como se señaló anteriormente, se ha reportado que pequeñas GTPasas pertenecientes a la familia Rab contribuyen a la liberación de exosomas (Colombo et al., 2014). En particular, 8 Rabs han sido asociadas con la secreción de los mismos en *Caenorhabditis elegans* y 5 de ellas (Rab2, Rab7, Rab11, Rab27, and Rab35) poseen un rol en la formación de VEs en otros organismos (Hyenne et al., 2015; Ostrowski et al., 2010). Sin embargo, el rol específico que dichas proteínas cumplen en la liberación de exosomas todavía no ha sido definido. En *G. lamblia*, la secuenciación del genoma reveló un total de 12 proteínas Rabs anotadas, de las cuales solo Rab1, Rab2 y Rab11 fueron descritas (Castillo-Romero et al., 2010; Langford et al., 2002) siendo solo Rab11, la proteína asociada con la formación y/o liberación de tExo en otros tipos celulares (Savina et al., 2002).

Trabajos recientes realizados en *G. lamblia*, reportaron que GIVps4a se expresa en trofozoítos durante crecimiento y enquistamiento (Saha et al., 2018). Por otro lado, GIRab11 fue asociada a la citoquinesis (Hardin et al., 2017) y a la diferenciación del parásito (Castillo-Romero et al., 2010). Sin embargo, hasta el presente, el rol que poseen ambas proteínas en la formación y/o liberación de tExo no ha sido dilucidado.

#### 4.2.1 *Giardia lamblia* secreta vesículas con características de exosomas en el medio TYI-S-33 carente de suero bovino adulto y bilis bovina

Para testear los mecanismos involucrados en la formación y/o liberación de tExo en *G. lamblia*, fue necesario la puesta a punto de un protocolo nuevo y diferente al utilizado en la

**PARTE I**, el cual nos permita mantener a las células en un medio semejante al utilizado para su crecimiento y además preservar la fisiología de las mismas. Para ello, en esta sección optamos por incubar a los parásitos por un tiempo menor en el medio de cultivo de crecimiento sin el agregado de suero bovino adulto y bilis bovina (TYI-S-33/-sbb), para evitar la contaminación de exosomas provenientes de estas fuentes, tal como ha sido descrito para otros parásitos (Twu et al., 2013). Por lo tanto,  $1 \times 10^7$  trofozoítos de *G. lamblia* WB/1267 (ensamblaje A) se lavaron e incubaron durante 4 hs con medio (TYI-S-33/-sbb) y las vesículas se sedimentaron del medio de crecimiento mediante ultracentrifugación diferencial y filtración (**Figura 4.8**).



**Figura 4.8.** Procedimiento para el aislamiento de vesículas de tipo exosomas derivados de *G. lamblia*.

Así, para definir si las vesículas aisladas utilizando el nuevo protocolo poseían las características típicas de exosomas, resultaba imprescindible analizarlas utilizando MET. La fracción obtenida se observó al microscopio electrónico, revelando que, al igual que en la **PARTE I**, las vesículas poseían apariencia típica de copa y un tamaño de 50-100 nm, pero además se observó la presencia de vesículas más pequeñas de un tamaño aproximado de 30 nm (**Figura 4.9 A**).

Dado que está reportado que los exosomas poseen un tamaño característico, y para complementar los datos obtenidos por MET, se decidió obtener más información sobre las

vesículas aisladas utilizando tecnología DLS. La DLS mide las interacciones entre las partículas presentes en una solución según el movimiento que realizan en función de los cambios de temperatura y viscosidad del medio. Esto se usa a menudo para evaluar el tamaño, la carga y la reproducibilidad de diferentes preparaciones de liposomas u otras nanopartículas. De esta manera, se pudo analizar la distribución y los niveles de vesículas presentes en la muestra, pudiendo obtener más información sobre sus características de tamaño y concentración. Este análisis mostró dos poblaciones principales con un tamaño promedio de 30 y 100 nm para cada una (**Figura 4.9 B**).

A continuación, para lograr separar las dos poblaciones de vesículas obtenidas y, considerando que los exosomas poseen la capacidad de flotar selectivamente a una densidad comprendida entre 1,1 y 1,2 g/ cm<sup>3</sup> de sacarosa (They et al., 2006), realizamos un gradiente de sacarosa. Esto permitiría no solo poder separar ambas poblaciones de vesículas, sino, además, obtener una población enriquecida de tExo. Para ello, una vez que obtuvimos el pellet de vesículas mediante filtración y ultracentrifugación, el mismo se resuspendió en una solución de sacarosa de 2.5 M que se colocó sobre un gradiente lineal de sacarosa (2 M-0.25 M sacarosa) y se recogieron las fracciones luego de una ultracentrifugación. El análisis de inmunotransferencia de las fracciones de gradiente de sacarosa (F1-F7) mostró un enriquecimiento de la proteína 14-3-3 (GL50803\_6430), la cual hemos observado anteriormente que es componente de las tExo, a densidades que varían de 1.25 a 1.09 g/cm<sup>3</sup> (**Figura 4.9 C**).

Restaba determinar si las fracciones que habían sido positivas para la proteína 14-3-3 presentaban además vesículas con forma y tamaño característico de exosomas. El análisis de DLS de todas las fracciones mostró que la F2 poseía un 99,7% de vesículas con un tamaño entre 30-100 nm (**Figura 4.9 D y Tabla 4.3**). Por otro lado, por MET, observamos que la misma fracción estaba enriquecida en vesículas con doble membrana de aproximadamente 50 nm (**Figura 4.9 E**).

Fracción	Tamaño de partículas	% Población
F1	1-30 nm	100.0
	31-100 nm	0.0
	101-550 nm	0.0
F2	1-30 nm	0.2
	31-100 nm	99.7
	101-550 nm	0.1
F3	1-30 nm	97.7
	31-100 nm	2.3
	101-550 nm	0.0
F4	1-30 nm	83.0
	31-100 nm	16.5
	101-550 nm	0.5
F5	1-30 nm	99.5
	31-100 nm	0.5
	101-550 nm	0.0
F6	1-30 nm	97.9
	31-100 nm	2.1
	101-550 nm	0.0
F7	1-30 nm	99.8
	31-100 nm	0.2
	101-550 nm	0.0

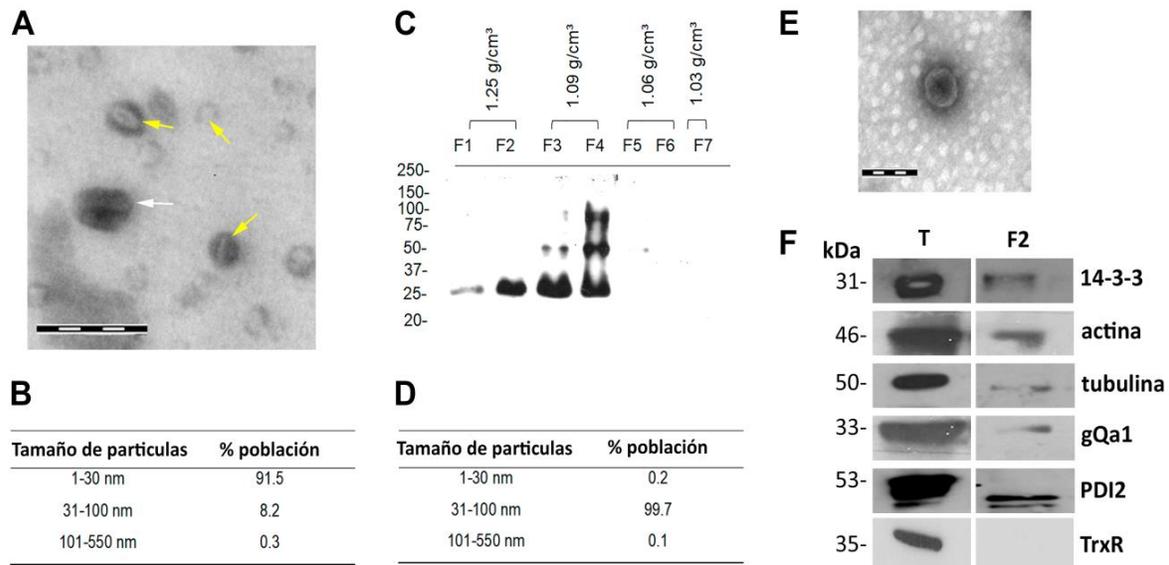
**Tabla 4.3. Tamaño de las VEs determinadas por DLS.** La tabla del análisis de DLS muestra las poblaciones de VEs obtenidas en las fracciones (F1-F7) del gradiente de sacarosa.

Con estos resultados, pudimos determinar que las vesículas obtenidas en la F2 no solo estaban enriquecidas en la proteína 14-3-3, sino que las mismas poseían un tamaño comprendido entre 31-100 nm, que es consistente con los tamaños conocidos de exosomas.

Las características más distintivas de los exosomas, además de la forma y el tamaño, es la presencia de proteínas denominadas marcadores exosomales. Hasta el momento, pudimos comprobar que las vesículas aisladas presentaban forma y tamaño típico, por lo tanto, nos preguntamos si podríamos encontrar proteínas de tipo marcadores. Así, se decidió evaluar mediante ensayos de inmunotransferencia la presencia de proteínas que habían sido positivas en el ensayo de espectrometría de masa (**Anexo I**), las cuáles incluyeron actina giardial (GL50803\_40817), tubulina (GL50803\_103676), la SNARE gQa1 (GL50803\_7309) (una proteína asociada a las PVs) (Babst et al., 1998; Elias et al., 2008; Jackson et al., 2017) y la proteína chaperona del retículo endoplásmico disulfuro isomerasa 2 (PDI2) (GL50803\_9413) (Lin et al., 2005). La inmunotransferencia se realizó utilizando trofozoítos *wb/1267* homogeneizado y la fracción F2. Los resultados arrojaron que los “marcadores de exosomas” 14-3-3, actina y alfa-tubulina estaban presentes en la fracción enriquecida F2 junto con Qa1 y PDI2 (**Figura 5.3 F**). Como control de este experimento se analizó además la presencia de una enzima citosólica tiorredoxina reductasa (TrxR) (GL50803\_9827), la cual no fue encontrada en las fracciones enriquecidas con exosomas (**Figura 4.9 F**).

La información provista por estos resultados, sugiere que las vesículas aisladas podrían representar verdaderos exosomas ya que poseen la forma, el tamaño y la presencia de proteínas marcadoras. Además, la ausencia de la enzima TrxR sugiere que el cargo en estas vesículas es específico, la presencia de la SNARE gQa1 asociada a las membranas de las PVs señala la posibilidad de que los exosomas se originen a partir de estas vacuolas y, finalmente, la aparición de la chaperona PDI-2 residente del retículo endoplásmico sugiere una posible conexión entre el retículo endoplásmico y las PVs en el parásito *G. lamblia*.

Los resultados obtenidos hasta el momento nos permitieron confirmar que el parásito *G. lamblia* tendría la capacidad de poder liberar al medio extracelular tExo en un medio TYI-S-33/-sbb. El siguiente paso fue indagar sobre los mecanismos involucrados en la biogénesis y liberación de los mismos. Para responder a este interrogante se llevaron a cabo diversos ensayos que se detallan a continuación.



**Figura 4.9. Las vesículas tipo exosomas aisladas de *G. lamblia* poseen forma, tamaño típico y presencia de marcadores exosomales.** (A) Las vesículas aisladas tipo exosomas se contrastaron con acetato de uranilo y se observaron por MET. Se observa vesículas con aspecto exosomal que poseen forma de copa con un tamaño alrededor de 70 nm (flecha blanca) y vesículas con un tamaño de 20-25 nm (flechas amarillas). Barra 100 nm. (B) La tabla del análisis de DLS muestra la presencia de vesículas de 31-100 nm y vesículas más pequeñas de 1-30 nm. (C) Análisis de inmunotransferencia de las fracciones del gradiente de sacarosa muestran un enriquecimiento de la proteína 14-3-3 en las fracciones F2, F3 y F4. (D) La tabla con el análisis de DLS muestra un pico de vesículas del tamaño entre 31-100 nm en F2. (E) Tinción negativa de ME muestra el enriquecimiento de vesículas en forma de copa de alrededor de 80 nm en F2. Barra de 100 nm. (F) El análisis de inmunotransferencia de trofozoítos de tipo salvaje WB/1267 (T) y la fracción enriquecida en exosomas (F2) resultaron positivas para la proteína 14-3-3, actina, tubulina, gQa1 y PDI2. Se usó la enzima citoplasmática TrxR como control negativo para la fracción F2. Cada MW (en kDa) es ilustrado a la izquierda.

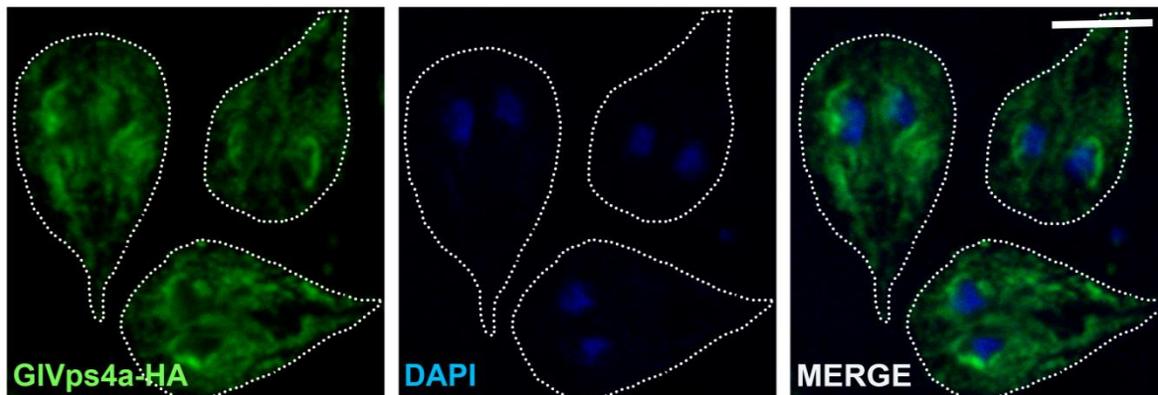
#### 4.2.2 Formación y liberación de exosomas en *Giardia lamblia*

La formación de exosomas es un proceso altamente regulado y se conoce que la maquinaria ESCRT es uno de los mecanismos que se encuentra principalmente involucrados en su formación (Colombo et al., 2013). Por otro lado, pequeñas GTPasas fueron relacionadas a la liberación de los mismos (Baietti et al., 2012; Bobrie et al., 2012; Hoshino et al., 2013; Hsu et al., 2010; Savina et al., 2002). Una posibilidad era que en *G. lamblia*, el proceso de formación o liberación de vesículas tipo exosomas también se encuentre conservado. Así, en este trabajo, se decidió entonces estudiar el papel del complejo ESCRT analizando la participación de la AAA ATPasa Vps4a (GIVps4a) y el papel de la pequeña GTPasa Rab11 (GIRab11).

4.2.2.1 GIVps4a está involucrada en la formación de vesículas intraluminares y vesículas del tipo exosomas.

4.2.2.1.1 *GIVps4a-HA posee una distribución reticular en trofozoítos*

En eucariotas superiores, la proteína del tipo Vps4a se encuentran principalmente localizada en endosomas tardíos y en la membrana citoplasmática. Para poder determinar la localización de GIVps4a, se generaron trofozoítos transgénicos *glvps4a-ha* que sobre-expresan de manera estable la proteína de fusión GIVps4a-HA bajo el control de un promotor fuerte de tubulina y con una etiqueta HA en la región C-terminal. Posteriormente, a través de ensayos de IF y microscopía confocal se encontró que la proteína en estudio posee una distribución reticular y además puede observarse cerca de la membrana plasmática (posiblemente en las PVs) (**Figura 4.10**).



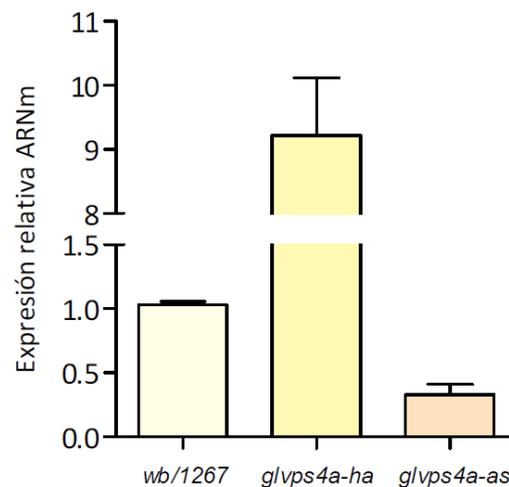
**Figura 4.10. Localización subcelular de GIVps4a-HA en trofozoítos transgénicos.** La proteína GIVps4a-HA (verde) se encuentra localizada principalmente en retículo endoplásmico pero puede observarse cerca de la membrana plasmática (posiblemente en las PVs). Se utilizó DAPI (azul) para teñir los núcleos. Las imágenes fueron adquiridas con microscopía confocal. Barra de escala: 5  $\mu$ m.

4.2.2.1.2 *La disminución de la expresión de GIVps4a altera la liberación de vesículas tipo exosomas en Giardia lamblia.*

Existen una variedad de trabajos que respaldan la participación de la maquinaria ESCRT principalmente de la AAA ATPasa Vps4 en la biogénesis de los exosomas durante el proceso de formación de las ILVs en los endosomas tempranos (Huotari and Helenius, 2011). La expresión de esta proteína fue relevante para generar exosomas en la línea embrionaria celular de riñón (Jackson et al., 2017). Por otro lado, en levaduras, la pérdida de Vps4 resulta

en acumulación de componentes ESCRT en membranas y un deterioro de clasificación de carga (Babst et al., 1998). Así, para poder indagar sobre la participación de Vps4a en la formación de vesículas tExo en *G. lamblia*, fue necesario generar células transgénicas deficientes en GIVps4a.

Si bien regular negativamente la expresión génica en *G. lamblia* no es una tarea sencilla debido a la naturaleza poliploide de su genoma (Adam, 2001), una alternativa valiosa consiste en el empleo de ARN anti-sentido (ARN-AS) específicos. Así, para silenciar el gen de *glvps4a* se utilizó el vector de expresión pTubApa-H7-HApac (ver M&M SECCIÓN 3.3.3) en el que se clonaron los nucleótidos del 1 al 1035 del ORF de *glvps4a* en el sentido opuesto, generándose así el vector pGIVps4a-AS. Luego de la transfección y selección de trofozoítos transgénicos *glvps4a:as*, se analizó el efecto del ARN-AS en la expresión del RNAm de *glvps4a* mediante qRT-PCR. Los resultados mostraron una inhibición de la expresión del RNAm de GIVps4a en células *glvps4a:as*, si se la compara con trofozoítos salvajes *wb/1267* y trofozoítos transgénicos *glvps4a-ha* (Figura 4.11). Por otra parte observamos que trofozoítos transgénicos *glvps4a-ha* poseían una sobre-expresión marcada con respecto a los trofozoítos salvajes *wb/1267* (Figura 4.11).



**Figura 4.11. Disminución en la expresión de GIVps4a.** La expresión de ARNm de GIVps4a en trofozoítos salvajes (*wb/1267*) y transgénicos *glvps4a-ha* y *glvps4a:as*, mediante qRT-PCR. El ensayo fue realizado utilizando cebadores específicos para el gen de *glvps4a*. Los niveles de transcripto fueron normalizados con el gen 18S. Las barras de error indican la desviación estándar para experimentos con más de un ensayo.

Con la intención de evaluar si GIVps4a participaba en la formación de vesículas tExo, los trofozoítos transfectados con los vectores pGIVps4a-HA, pGIVps4a-AS y los de tipo salvajes (*wb/1267*), se cultivaron hasta alcanzar la fase logarítmica. Las monocapas de los trofozoítos fueron lavadas con PBS dos veces y el medio de crecimiento fue reemplazado por un medio de crecimiento carente de suero bovino adulto y bilis bovina, para evitar la contaminación de exosomas provenientes de esas fuentes. Después de 4 horas de incubación el sobrenadante fue filtrado utilizando filtros de 0.11  $\mu\text{M}$  seguido de ultracentrifugaciones a alta velocidad y el pellet se resuspendió en PBS. A continuación, la producción o la variación del tamaño de los exosomas producidos por las células salvajes y las transgénicas fue testada mediante DLS. Los resultados mostraron que el tamaño del pico de las vesículas producido por las células de tipo salvaje y células transgénicas *glvps4a-ha* y *glvps4a-as* era entre 30 y 100 nm de tamaño; sin embargo, el dato que resultó más sorprendente fue que hubo una reducción significativa en la producción de exosomas en los trofozoítos que se encuentran silenciados para el gen *glvps4a* (**Tabla 4.4**), sugiriendo que GIVps4a podría estar teniendo un papel importante en la producción o secreción de exosomas en el parásito *G. lamblia*.

Cepa	% tExo (30-100 nm)
<i>Salvaje wb/1267</i>	8.0
<i>glvps4a-ha</i>	7.3
<i>glvps4a-as</i>	2.8

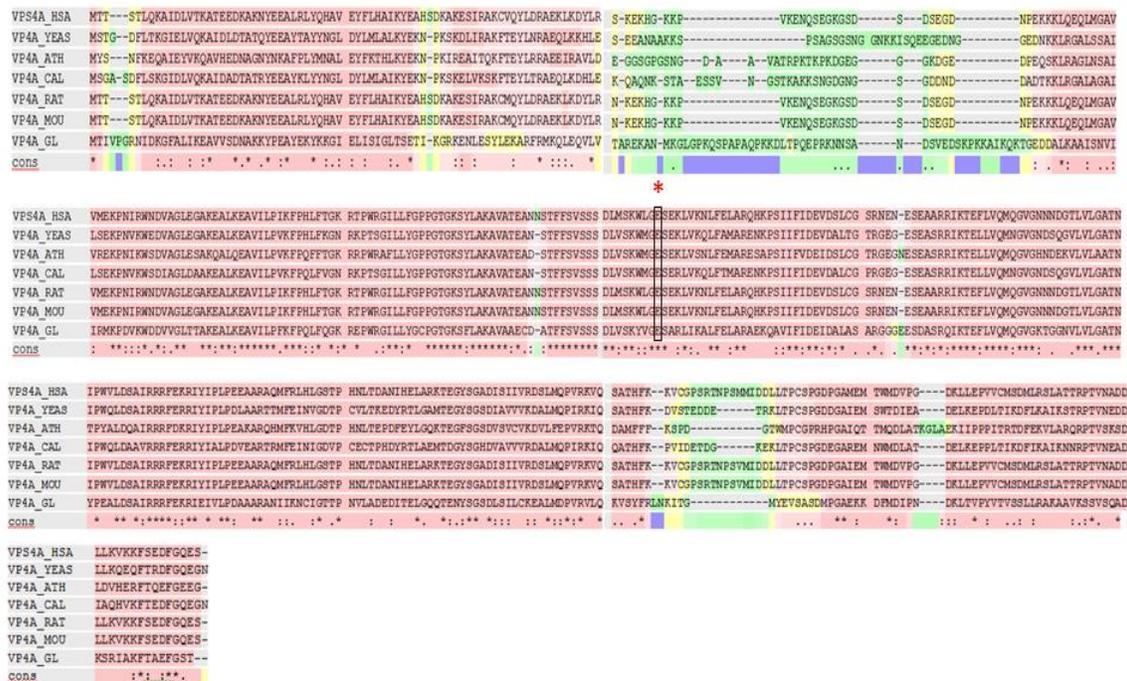
**Tabla 4.4. La disminución de la expresión de GIVps4a afecta la liberación de exosomas.** Tabla del ensayo de DLS muestra la variación en la liberación de tExo en trofozoítos salvajes (*wb/1267*) y trofozoítos transgénicos (*glvps4a-ha* y *glvps4a:as*).

#### 4.2.2.1.3 La función ATPasa de Glvps4a es clave para la formación de vesículas intraluminares y vesículas de tipo exosomas

Generar la escisión de la membrana para formar las ILVs dentro de los endosomas tempranos y la posterior disociación de los complejos ESCRT, ha sido considerada la función más importante de la proteína Vps4. En células de levaduras, ha sido demostrado que la función de Vps4 depende de la actividad ATPasa (Babst et al., 1998). Se ha demostrado que la proteína Vps4 en humanos y otras especies se une a ATP gracias a la presencia de los motivos

WALKER A/B ubicados en el dominio ATPasa grande y el pequeño (**Figura 4.12**) (Babst et al., 1998; Scott et al., 2005a).

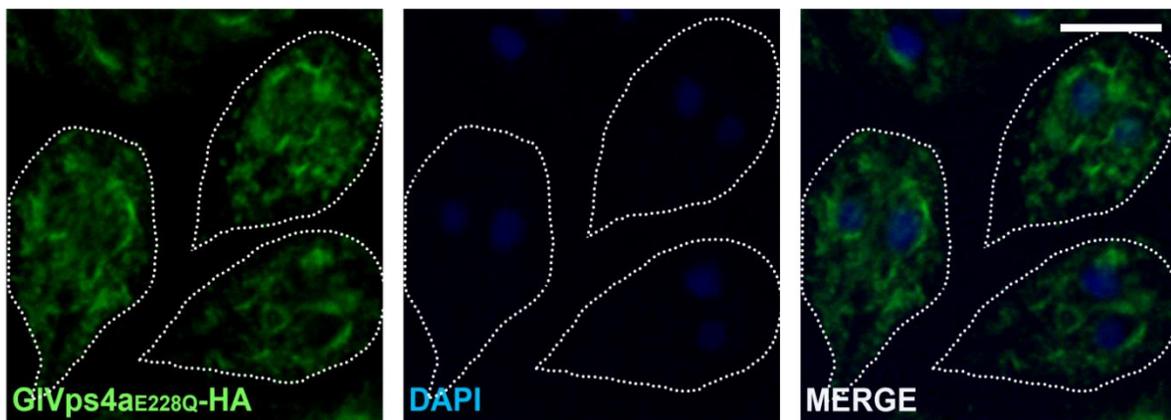
En diferentes trabajos se han estudiado los residuos críticos de los motivos Walker A/B involucrados en la actividad ATPasa y, por lo tanto, en la liberación de exosomas (Babst, 2011). Así, mediante la generación de variantes puntuales de varios residuos de aminoácidos presentes en ambos motivos y estudiando la liberación de vesículas en las mutantes generadas, encontraron que la sustitución de un aminoácido E en la posición 228 (E228) por una Q impedía la hidrólisis de ATP y por lo tanto el desmontaje del complejo en diferentes líneas celulares (Allen et al., 2007; Azmi et al., 2006; Babst et al., 1997; Scott et al., 2005a; Stuchell-Breton et al., 2007; Xiao et al., 2007; Xiao et al., 2008). Se encontró además que en las células de mamíferos donde se expresaba la proteína mutante E228, se producía una acumulación de los componentes ESCRT en endosomas tardíos y retrasaba la maduración de las vesículas internas (Bishop and Woodman, 2001; Fujita et al., 2003). Estos resultados nos llevaron a avanzar en el estudio de la función de la actividad ATPasa de GlVps4 comenzando con la identificación de este residuo conservado para poder producir la mutación (**Figura 4.12**).



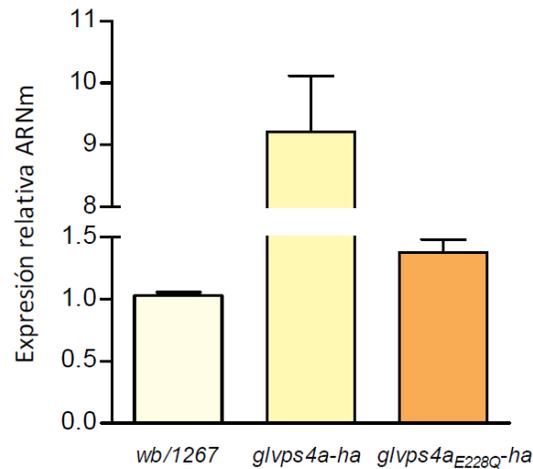
**Figura 4.12. Alineamiento de secuencia de aminoácidos de Vps4a.** Se muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína Vps4a de humano (Vps4a\_HSA), Vps4a de levaduras (Vps4a\_YEAS), Vps4a de *Arabidopsis thaliana* (Vps4a\_ATH), Vps4a de *C. elegans* (Vps4a\_CAL), Vps4a de rata (Vps4a\_RAT), Vps4a de ratón (Vps4a\_MOU) y Vps4a de *G. lamblia* (Vps4a\_GL).

Residuos estrictamente conservados se muestra con asterisco (\*) mientras que los aminoácidos conservados en al menos 2 de las 4 secuencias se muestran con dos puntos (:). \*rojo y el recuadro muestra el aminoácido E en la posición 228.

Estas predicciones nos alentaron a realizar la sustitución de este aminoácido a fin de poder evaluar si la proteína mutada era capaz de impedir o inhibir la liberación de tExo al medio de cultivo y, si este fuera el caso, contar con la posibilidad de utilizar la sobre-expresión de esta proteína mutada para evaluar la función de GLVps4a en trofozoítos. Así, mediante mutagénesis sitio-dirigida sobre el vector pGLVps4a-HA, se obtuvo el gen que codifica para la proteína mutada GLVps4a<sub>E228Q</sub>-HA, con la posibilidad de generar así un clon mutante de GLVps4a. Ensayos de IF mostraron que GLVps4a<sub>E228Q</sub>-HA se encontraba distribuida en retículo endoplásmico y cerca de la membrana plasmática, observándose que no hubo cambios significativos en el patrón de localización con respecto a los trofozoítos *glvps4a-ha*, lo que nos estaría indicando que podría estar actuando como una mutante negativa (**Figura 4.13**). Además, mediante ensayos de qRT-PCR se observó que el ARNm de GLVps4a se expresaba más en trofozoítos *glvps4a<sub>E228Q</sub>-ha* que en salvajes (*wb/1267*), aunque en menor cantidad que en los trofozoítos transgénicos *glvps4a-ha* (**Figura 4.14**).



**Figura 4.13. Localización subcelular de GLVps4a<sub>E228Q</sub>-HA en trofozoítos transgénicos.** La proteína GLVps4a<sub>E228Q</sub>-HA (verde) se encuentra localizada principalmente en retículo endoplásmico y posiblemente en vacuolas periféricas. Se utilizó DAPI (azul) para teñir los núcleos. Las imágenes fueron adquiridas con microscopía confocal. Barra de escala: 5 μm.



**Figura 4.14. Expresión de GLVps4a<sub>E228Q</sub>.** La expresión de ARNm de GLVps4a en trofozoítos salvajes (*wb/1267*) y transgénicos *glvps4a-ha* y *glvps4a<sub>E228Q</sub>*, mediante qRT-PCR. El ensayo fue realizado utilizando cebadores específicos para el gen de *glvps4a*. Los niveles del transcripto fueron normalizados con el gen 18S. Las barras de error indican la desviación estándar para experimentos con más de un ensayo.

A continuación, para poder indagar sobre el rol que posee la actividad ATPasa de GLVps4a en la formación de vesículas tExo en *G. lamblia*, se extrajeron tExo de los trofozoítos que sobreexpresan la proteína mutada GLVps4a<sub>E228Q</sub>-HA. Así, se cuantificaron las vesículas tExo aisladas y se compararon con las secretadas por los trofozoítos salvajes y transgénicos *glvps4a-ha* y *glvps4a-as* (Tabla 5.2) para evaluar si, efectivamente, la mutación E228Q en GLVps4a impedía la liberación de vesículas, tal como había sido descrito para la mutante de Vps4 en levaduras (Babst et al., 1998). Cuando se analizó la liberación de exosomas por parte de los trofozoítos transgénicos *glvps4a<sub>E228Q</sub>-ha*, se observó que no había liberación de vesículas.

Cepa	% tExo (30-100 nm)
<i>Salvaje wb/1267</i>	8.0
<i>glvps4a-ha</i>	7.3
<i>glvps4a-as</i>	2.8
<i>glvps4a<sub>E228Q</sub>-ha</i>	0.0

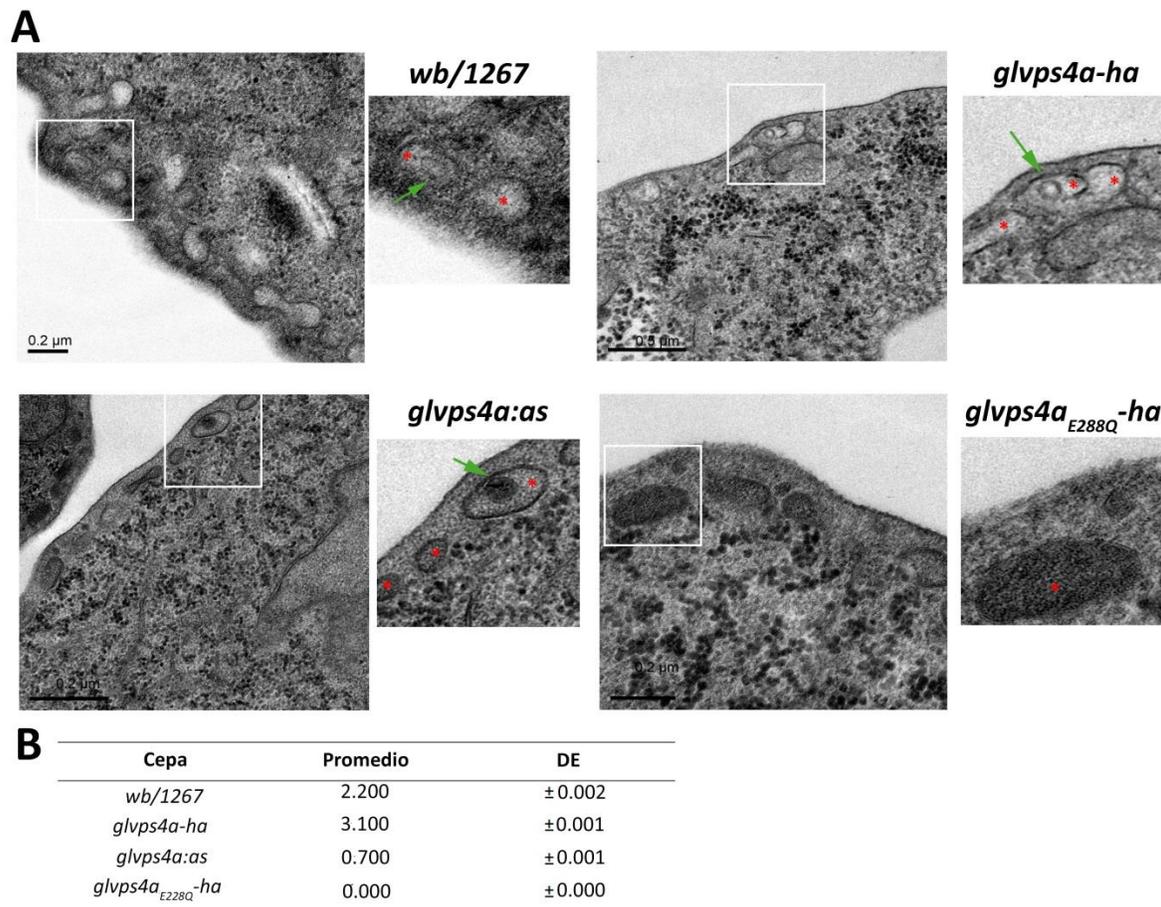
**Tabla 4.5. La actividad ATPasa de GLVps4a afecta la liberación de exosomas.** Tabla del ensayo de DLS muestra la variación en la liberación de vesículas tipo exosomas en trofozoítos salvajes (*wb/1267*) y trofozoítos transgénicos (*glvps4a-ha*, *glvps4a:as* y *glvps4a<sub>E228Q</sub>-ha*).

Estos últimos resultados, cuando se analizan globalmente, señalan que GIVps4a posee una importante función en la secreción de exosomas siendo su actividad ATPasa esencial.

#### 4.2.2.1.4 Alteraciones en la expresión o función de GIVps4a produce acumulación de vesículas intraluminares en las vacuolas periféricas.

Las PVs han sido descritas como vacuolas de forma ovalada, heterogéneas en tamaño y densidad (Feely and Dyer, 1987; Friend, 1966), y son parte del sistema de membranas internas que participan en las vías endocítica de *G. lamblia* (Faso and Hehl, 2011). En el parásito, las PVs se ubican por debajo de la membrana plasmática y cumplen el rol de endosomas y lisosomas (Lanfredi-Rangel et al., 1998). Creemos, además, que las mismas podrían estar actuando como MVBs en trofozoítos salvajes. En vista de la información disponible, decidimos observar más en detalle la organización estructural de las PVs en trofozoítos en crecimiento. Para esto, se llevaron a cabo ensayos de MET utilizando las células de tipo salvaje y transgénicas *glvps4a-ha*, *glvps4a<sub>E228Q</sub>ha* y *glvps4a:as* (**Figura. 4.15 A**). Posteriormente, calculamos el porcentaje de PVs que contienen al menos una ILV (**Figura. 4.15 B**). Los resultados mostraron que hubo una menor cantidad de PVs conteniendo ILVs en trofozoítos *glvps4a:as*, comparados con células salvajes y *glvps4a-ha*, y una ausencia de ILVs en trofozoítos que no poseen actividad ATPasa (*glvps4a<sub>E228Q</sub>ha*).

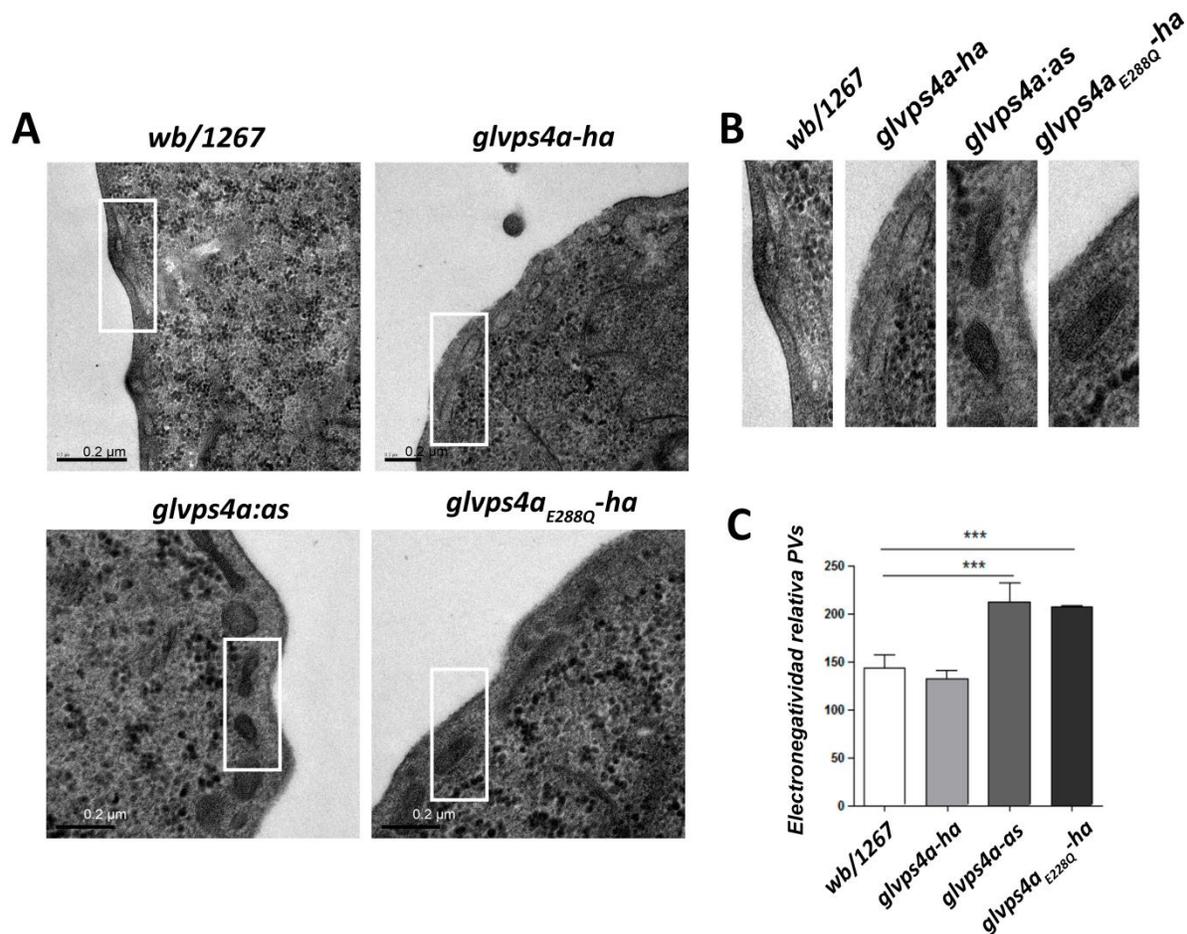
Estos resultados son consistentes con la marcada reducción de vesículas tExo liberadas en células *glvps4a:as* y *glvps4a<sub>E228Q</sub>ha*, sugiriendo que la expresión de GIVps4a activa es necesaria para la producción de exosomas en *G. lamblia*.



**Figura 4.15. Producción de ILVs en trofozoítos salvajes y transgénicos GIVps4a. (A)** MET de trofozoítos salvajes *wb/1267* y trofozoítos transgénicos *glvps4a-ha*, *glvps4a:as* y *glvps4a<sub>E228Q</sub>-ha* muestra la presencia de ILVs (flecha verde en el recuadro) dentro de las PVs (asterisco rojo en el recuadro). Barra de escala: 0.2  $\mu$ m. **(B)** La tabla muestra el porcentaje de PVs que contienen ILVs para cada cepa (n= 200).

#### 4.2.2.1.5 Cambios en la expresión y función de GIVps4a altera la electronegatividad de las vacuolas periféricas.

A través de MET, encontramos que los trofozoítos transgénicos con la expresión disminuida de GIVps4a (*glvps4a:as*) y los que sobre-expresan la mutante GIVps4a<sub>E228Q</sub>-HA (*glvps4a<sub>E228Q</sub>-ha*) muestran acumulación de material electrodenso en las PVs (**Figura 4.16 A**). Por el contrario, en las células *glvps4a-ha* que sobre-expresan GIVps4a-HA, no se observa una diferencia significativa de acumulación del material electrodenso en la mayoría de las PVs analizadas, comparado con la cepa salvaje *wb/1267* (One-Way ANOVA,  $p < 0,01$  y la prueba de Tukey) (**Figura 4.16 C**).



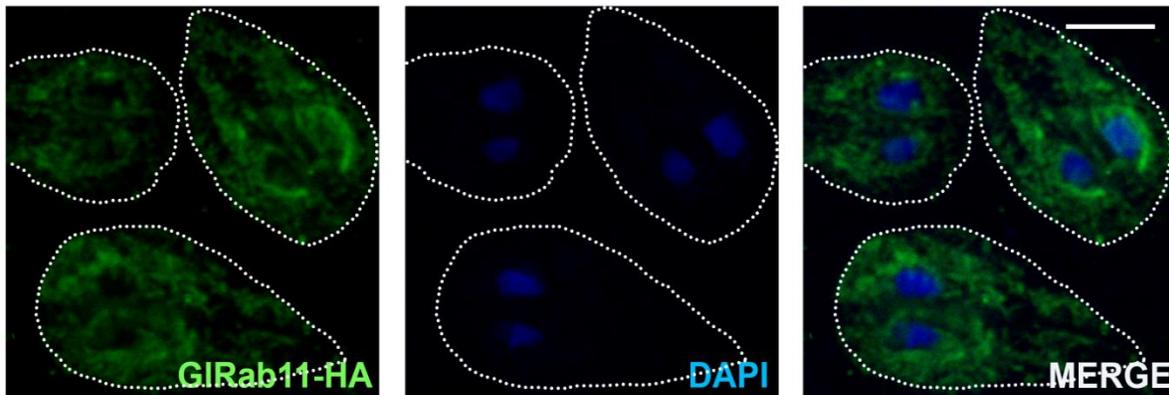
**Figura 4.16. Electronegatividad de las PVs en trofozoítos salvajes (*wb/1267*) y transgénicos *GIVps4a*.** (A) Imágenes obtenidas a través de TEM muestran acumulación de material electrodenso en trofozoítos transgénicos *glvps4a:as* y *glvps4a<sub>E288Q</sub>-ha* con respecto al control (cepa salvaje *wb/1267*). Las células que sobre-expresan *GIVps4a-HA* no muestran una diferencia de material electrodenso en la mayoría de las PVs analizadas respecto al control. Barra de escala: 0.2  $\mu$ m. (B) Se muestra una ampliación de las imágenes para observar en mayor detalle la acumulación de material electrodenso en células transgénicas *glvps4a<sub>E288Q</sub>-ha* y *glvps4a:as*. (C) El gráfico muestra el análisis cuantitativo de la electronegatividad. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

#### 4.2.2.2 *GI*Rab11 regula la formación de vesículas intraluminares y vesículas de tipo exosomas.

##### 4.2.2.2.1 *GI*Rab11p-HA está presente en retículo endoplásmico y vacuolas periféricas

La proteína Rab11 se encuentra localizada en endosomas de reciclaje y en membrana plasmática en humanos (Lindsay and McCaffrey, 2002, 2004; Peden et al., 2004; Sobajima et al., 2018). Para poder determinar la localización de la proteína Rab11 en *G. lamblia*, se generaron trofozoítos transgénicos *glrab11-ha* que contienen una copia del gen *glrab11* y sobre-expresan de manera estable la proteína de fusión *GI*Rab11p-HA, bajo el control del

promotor fuerte de tubulina y con una etiqueta HA en la región C-terminal. Posteriormente, a través de ensayos de IF y microscopía confocal se encontró que la proteína en estudio presenta una localización reticular (**Figura 4.17**).



**Figura 4.17. Localización subcelular de GIRab11-HA trofozoítos transgénicos.** La proteína GIRab11-HA (verde) se encuentra localizada principalmente en retículo endoplásmico. Se utilizó DAPI (azul) para teñir los núcleos. Las imágenes fueron adquiridas con microscopía confocal. Barra de escala: 5  $\mu$ m.

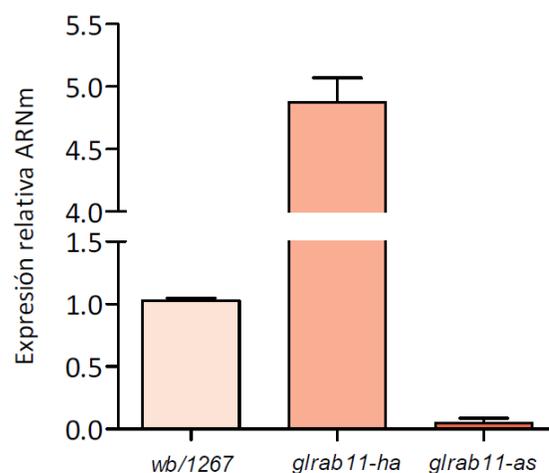
4.2.2.2.2 La disminución de la expresión de GIRab11 provoca una inhibición en la producción de vesículas tipo exosomas.

La proteína Rab11 fue la primera Rab que se reportó que estaba involucrada en la liberación de exosomas en la línea celular de leucémica K562. Se ha demostrado que la inhibición de Rab11 mediante la sobreexpresión de una mutante negativa disminuye la secreción de las proteínas TfR y HSC70 presentes en exosomas (Savina et al., 2002). Estas observaciones se confirmaron además en células de *Drosophila S2*, en las cuales se reportó que una disminución de Rab11 mediante dsARNs inhibía la secreción de pequeñas VEs (Beckett et al., 2013; Koles and Budnik, 2012).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, resultaba clave analizar si la proteína Rab11 de *G. lamblia* era capaz de llevar a cabo alguna función en la formación o liberación de exosomas en el parásito, tal como ocurre en otros tipos celulares.

Para abordar este análisis funcional, se utilizó una nueva estrategia con el fin de disminuir la expresión de GIRab11. Como mencionamos anteriormente, regular

negativamente la expresión génica en *G. lamblia* no es una tarea sencilla debido a la naturaleza poliploide de su genoma (Adam, 2001) y más considerando que en éste parásito fue demostrado que GIRab11 es necesaria para la citoquinesis (Hardin et al., 2017). Una alternativa valiosa consiste en el empleo de la técnica del ARN de interferencia (ARNi), en la cual se produce el silenciamiento génico post-transcripcional inducible debido a la expresión de ARNdc (Ullu et al., 2002). Nuestro laboratorio ha desarrollado una adaptación de la técnica para la depleción funcional inducible de la expresión de genes en el parásito, que consiste en la producción de fragmentos largos de ARN doble cadena (ARNdc) (Touz et al., 2004). Así, para silenciar el gen de *glrab11* se utilizó el vector de expresión de **pINDG-RNAi** (ver **M&M SECCIÓN 3.3.4**), en el que se clonaron nucleótidos del 1-639 del marco del ORF de *glrab11*, generándose así el vector **pdsRNAglrab11**. Luego de la transfección y selección de trofozoítos transgénicos *ds-rab11*, la producción del ARNdc fue inducida mediante la adición de 10 µg/mL de Tet. 48 hs después, se analizó el efecto del ARNdc en la expresión del ARNm de *glrab11* mediante qRT-PCR, revelando una inhibición de la expresión si se la compara con trofozoítos salvajes *wb/1267* (**Figura 4.18**). Por otra parte, observamos que trofozoítos transgénicos *glrab11-ha* poseían una sobre-expresión marcada con respecto a los trofozoítos salvajes *wb/1267* (**Figura 4.18**).



**Figura 4.18. Expresión de GIRab11p en trofozoítos salvajes y transgénicos.** La expresión de ARNm de GIRab11p en trofozoítos salvajes *wb/1267* y transgénicos *glrab11-ha* y *ds:glrab11*, mediante qRT-PCR. El ensayo fue realizado utilizando cebadores específicos para el gen de *glrab11*. Los niveles del transcripto fueron normalizados con el gen 18S. Las barras de error indican la desviación estándar para experimentos con más de un ensayo.

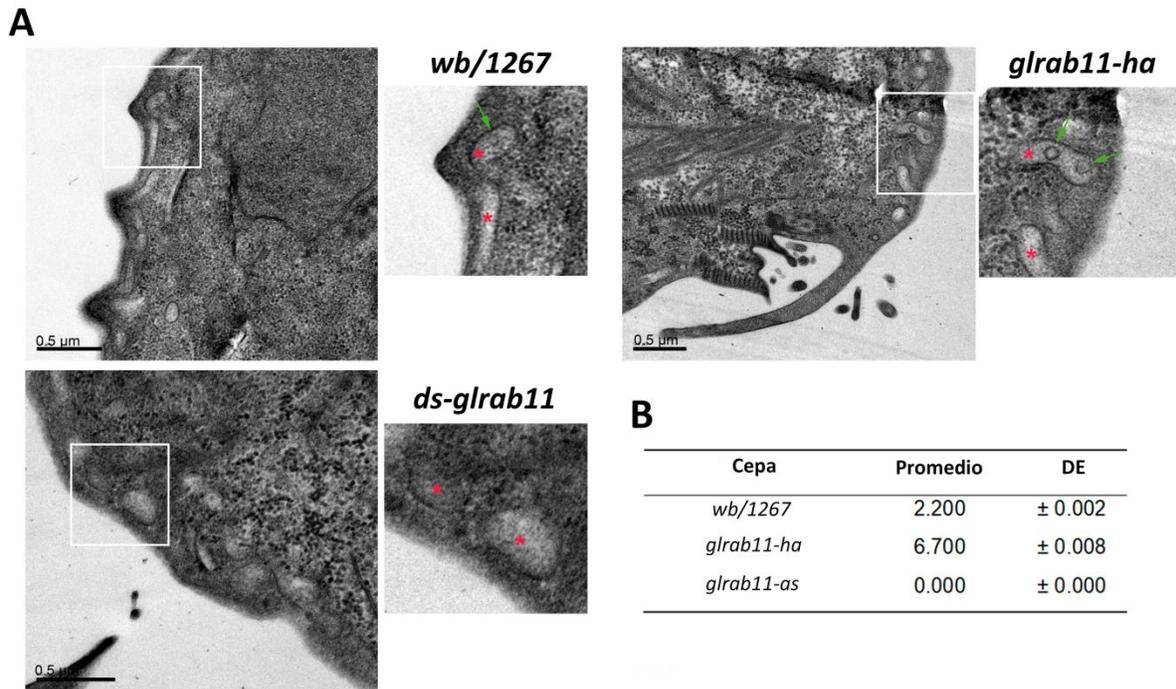
La evaluación del efecto de la expresión de GIRab11 sobre la secreción de exosomas se realizó mediante DLS. Los trofozoítos salvajes *wb/1267* y transgénicos *glrab11-ha* y *ds:glrab11* se cultivaron hasta alcanzar la fase logarítmica. A continuación, se extrajeron los exosomas según el protocolo descrito en la sección 3.1.5 de M&M y se midió la producción o variación del tamaño de las vesículas obtenidas mediante DLS. Este análisis mostró que la sobreexpresión de GIRab11-HA no aumentó la liberación de vesículas de 30-100 nm, si se lo compara con los exosomas secretados de trofozoítos salvajes, mientras que la disminución de la expresión de GIRab11 inhibió la secreción de vesículas tipo exosomas (**Tabla 4.6**).

Cepa	% tExo (30-100 nm)
<i>Salvaje wb/1267</i>	8.0
<i>glrab11-ha</i>	2.8
<i>ds:glrab11</i>	0.0

**Tabla 4.6. Cambios en la expresión de GIRab11 afecta la producción de tExo.** Tabla del ensayo de DLS muestra la variación en la liberación de vesículas tipo exosomas en trofozoítos salvajes (*wb/1267*) y trofozoítos transgénicos (*glrab11-ha* y *ds:glrab11*).

#### 4.2.2.2.3 Cambios en la expresión de GIRab11p produce alteraciones en la producción de vesículas intraluminares en las vacuolas periféricas.

Para analizar si GIRab11 estaba involucrada en la biogénesis de ILVs o en la liberación de tExo, estudiamos la formación de ILVs por MET en trofozoítos salvajes (*wb/1267*) y transgénicos *glrab11-ha* y *ds:glrab11* (**Figura 4. 19 A**), mediante el análisis del porcentaje de PVs que contenían al menos una ILVs para cada caso. Los resultados mostraron que la biogénesis de ILVs dependió de la expresión de GIRab11 (**Figura 4. 19 B**). Curiosamente, observamos la presencia de dos o más ILVs en el interior de una PV solo en trofozoítos transgénicos *glrab11-ha*. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de GIRab11 favorece la producción de ILVs pero no la liberación de vesículas tipo exosomas en *G. lamblia*.



**Figura 4.19. Producción de ILVs en trofozoítos salvajes y transgénicos GIRab11. (A)** MET de trofozoítos salvajes *wb/1267* y trofozoítos transgénicos *glrab11-ha* y *ds:glrab11* muestra la presencia de ILVs (flecha verde en el recuadro) dentro de las PVs (asterisco rojo en el recuadro). Barra de escala: 0.2  $\mu\text{m}$ . **(B)** La tabla muestra el porcentaje de PVs que contienen ILVs para cada cepa (n= 200). DE: desviación estándar.

#### 4.2.3 Discusión

Desde su descubrimiento, los exosomas se han convertido en uno de los campos más prometedores en el área científica y biomédica debido a su amplio abanico de funciones. La secreción de estas vesículas es un mecanismo altamente conservado, resultando clave para la comunicación intercelular ya que están involucrados en la transferencia de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos de una célula dadora a una receptora (Colombo et al., 2014). La secreción de exosomas es un mecanismo que ha sido ampliamente estudiado en diversos organismos incluyendo parásitos protozoarios (Hessvik and Llorente, 2018), en los cuáles se han realizado numerosos estudios para comprender el papel de las vesículas en la comunicación intracelular, incluida la interacción parásito-parásito y parásito-hospedador. En este sentido, uno de los factores más relevante es que se demostró que los exosomas de los parásitos protozoarios transfieren virulencia y factores de señalización que alteran la respuesta inmune de la célula hospedadora (Jackson et al., 2017; Vale, 2000).

En nuestro modelo de estudio, *G. lamblia*, el sistema endosomal/lisosomal exhibe una complejidad y diversidad significativa en términos de morfología y función, aunque su maquinaria de transporte es en parte conservada (Touz et al., 2012). En este sentido, anteriormente hemos sugerido que este organismo conserva un conjunto muy reducido de proteínas pertenecientes a la maquinaria ESCRT y de proteínas implicadas en el tráfico celular como las pequeñas GTPasas Rabs, así como la ausencia de MVBs típicos. Sin embargo, los resultados presentados en esta tesis sugieren que *G. lamblia* tiene la capacidad de formar y liberar al medio extracelular tExo.

En este trabajo, se han aislado y caracterizado las tExo secretadas por el parásito utilizando el medio (TYI-S-33/-sbb). Para la extracción de tExo fue necesaria la puesta a punto de un método nuevo de aislamiento, que nos permitió obtener vesículas enriquecidas y además mantener a las células en un medio de cultivo semejante al utilizado para su crecimiento, como una manera de preservar su fisiología lo más parecido a lo que podría ocurrir *in vivo*.

Los resultados obtenidos también mostraron que, a pesar de la falta de MVBs típicos en el parásito, se pueden formar vesículas de tipo exosomas en las PVs, ya que las proteínas asociadas con la membrana de estas organelas como la SNARE gQa1 (Elias et al., 2008), se encontró enriquecida en las fracciones exosómicas obtenidas de cultivos axénicos de trofozoítos WB en crecimiento. Estos resultados son respaldados por una publicación reciente que sugiere que las PVs de *G. lamblia* contienen ILVs y que además podrían estar actuando como MVB atípicos, considerando además que las PVs pueden ser los únicos componentes del sistema endo-lisosomal en el parásito (Midlej et al., 2019). Curiosamente, la presencia de PDI-2 en la fracción exosómica sugiere una relación entre el retículo endoplásmico y las ILVs, en coincidencia con los trabajos que describen que el RE y las PVs están de alguna manera interconectados (Abodeely et al., 2009). Esta observación difiere de otros informes que sugieren que los exosomas carecen de proteínas provenientes de compartimentos intracelulares que no están asociados a la vía endosomal/lisosomal (Raposo and Stoorvogel, 2013). En este sentido, y apoyando los hallazgos presentados en este capítulo, se encontró que: *i*) la enzima ESCP (del inglés *Encystation-specific Cysteine Protease*), una proteína de membrana de las PVs, estaba presente en los tExo; *ii*) que la enzima soluble AcPh, presente en el lumen de las PVs, estaba ausente del análisis proteómico y *iii*) que, además de PDI-2 que se encuentra en la membrana del ER, otras proteínas presentes en el lumen del RE como PDI-1,

PDI-3, PDI-4, PDI-5 y la chaperona BiP, fueron detectadas en tExo (**ver PARTE I y Anexo I**). En este escenario más completo, podemos hipotetizar que las vesículas tipo exosomas se forman en las PVs como ILVs pero que, debido a la interconexión entre el RE y las PVs en este parásito, alguna de las proteínas de membrana y proteínas solubles del ER forman también parte de estas ILVs. Por el contrario, moléculas que se encuentran en el lumen de las PVs, como AcPh, son excluidas, similar a lo que sucede con proteínas solubles de los endosomas en formación de los MVBs. Futuros experimentos serán necesarios para analizar cómo y bajo qué circunstancias estas organelas interactúan.

El descubrimiento de que la maquinaria ESCRT está involucrada en la biogénesis de ILVs en los MVBs enriqueció el nuevo campo del estudio de los exosomas. En busca de la participación de la maquinaria ESCRT en la biogénesis de ILVs y vesículas tipo exosomas en trofozoítos de *G. lamblia*, nos centramos en evaluar la participación de la ATPasa Vps4 debido a que es una proteína crucial en este proceso en diferentes organismos (Babst, 2011). En este trabajo de tesis, observamos que cuando se reduce su expresión, la formación de ILVs en las PVs y la liberación de tExo se reducía significativamente. Estos hallazgos fueron enriquecidos cuando se encontró que la expresión de la versión no activa de GIVps4a inhibía completamente la formación de ILVs y tExo, mostrando que no solo la presencia de GIVps4a sino también la actividad de la enzima eran fundamentales para la producción de tExo en el parásito. En el caso de *G. lamblia*, la ausencia de componentes ESCRT se correlaciona con la falta de genes que codifica para ESCRT-I, -II y varias subunidades de ESCRT-III y proteínas accesorias presentes en *P. falciparum*, *T. gondii* y *C. parvum* (Field and Dacks, 2009). Además, una diferencia significativa entre *G. lamblia* y los otros organismos anteriormente mencionados es que los últimos poseen estructuras morfológicamente semejantes a MVBs (Willms et al., 2018; Yang et al., 2004). Aún así, el papel funcional de una maquinaria reducida es consistente con estudios previos que muestran que *G. lamblia* posee una versión minimalista pero funcional de mecanismos más complejos presentes en otros eucariotas (Feliziani et al., 2015, Rivero et al., 2010, Touz et al., 2004, Touz et al., 2008).

En este trabajo de tesis, se mostró además que tanto la disminución de la expresión GIVps4a como la sobre-expresión de una proteína GIVps4a no-funcional, produjo una acumulación inusual de material electrodensito dentro de las PVs. Estas características fueron previamente observadas por el tratamiento de los trofozoítos salvajes con lactoferrina, un metabolito antimicrobiano natural y una de las defensas no específicas más importantes de

los mamíferos contra las infecciones microbianas (Eckmann, 2003; Frontera et al., 2018; Turchany et al., 1997). Además, un efecto similar se observó en trofozoítos que no expresaban el adaptador monomérico de clatrina GIENTHp (Feliziani et al., 2015). Tanto LF como GIENTH se asociaron a la endocitosis y al transporte de proteínas que involucra a las PVs en el parásito. En este sentido, nuestros resultados actuales sugieren que GLVps4a puede poseer una función adicional en la clasificación y la gemación de proteínas a partir de las PVs.

En el proceso de liberación de exosomas se ha observado que las proteínas Rabs, , más específicamente Rab2, Rab7, Rab11, Rab27a y Rab35 podrían tener un papel clave en la liberación de exosomas en algunos tipos celulares (Baietti et al., 2012; Hsu et al., 2010; Ostrowski et al., 2010; Savina et al., 2002). Cuando analizamos la participación de GIRab11 en la producción de tExo en *G. lamblia*, encontramos que era crítica para la génesis de ILVs en células transgénicas que carecen de Rab11. Por el contrario, la sobreexpresión de GIRab11 aumentó el número de PVs que contienen ILVs pero no la liberación de tExo, sugiriendo que GIRab11 también participa en la biogénesis de ILVs pero no en la liberación de vesículas tipo exosomas. Así, es posible establecer que el papel específico de las proteínas Rabs en la biogénesis y liberación de exosomas parece ser específico de especies y concuerda con el papel de Rab11 en otros organismos en los que se ha asociado con la membrana de la red trans-Golgi y vesículas secretoras, además de su función en la vía exocítica (Colombo et al., 2014; Chen et al., 1998).

Respecto a los mecanismos independientes de ESCRT, recientemente hemos publicado un trabajo que muestra que la adición de ceramida exógena aumentó marcadamente la formación de ILVs dentro de las PVs (Moyano et al., 2019). Se sabe que, además de las proteínas, los lípidos son una molécula crucial para la formación de ILVs y exosomas y el análisis de la composición lipídica puede ayudar a comprender su papel biológico. El enriquecimiento de ceramida se mostró en las membranas de las ILVs y fracciones exosómicas en otros organismos (Trajkovic et al., 2008). Una propuesta es que la ceramida puede inducir la curvatura de la membrana, facilitando la formación de ILVs independientemente de la composición de proteínas (como las ESCRT y tetraspaninas) (Edgar et al., 2014; Stuffers et al., 2009). Nuestros resultados revelaron que la ceramida exógena está localizada en las membranas del retículo endoplásmico, PVs e ILVs, lo que demuestra que, como en otras células, la ceramida es un componente de las ILVs en este parásito y que el agregado de ceramida exógena aumenta la formación de ILVs dentro de las PVs. Estos resultados son un

avance hacia una detección lipidómica completa de los tExo en *G. lamblia*, que puede ayudar a dilucidar si la biogénesis de exosomas es un proceso multimolecular e independiente en este parásito.

**Conclusiones finales**

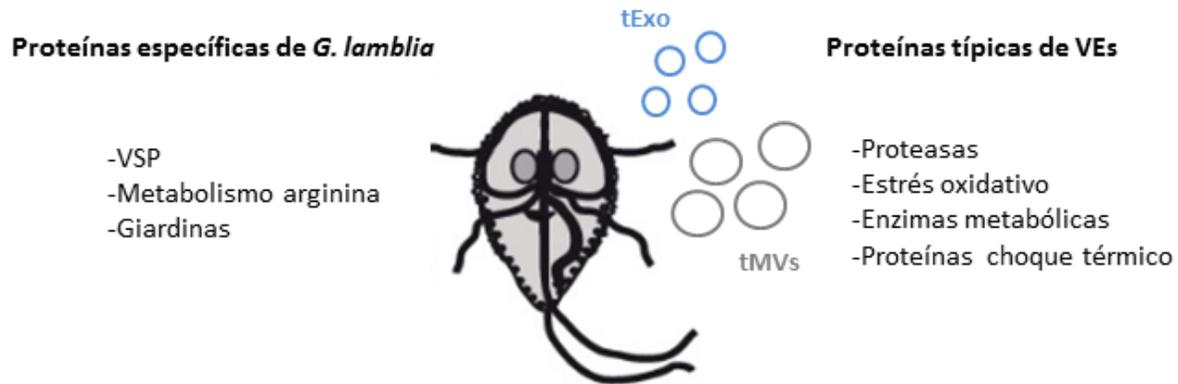
## 5. CONCLUSIONES FINALES

En la mayoría de las células, existen diversos mecanismos que les permite comunicarse entre sí. Recientemente, se describió un tercer mecanismo de comunicación intercelular que involucra la liberación de VEs, las cuáles son portadoras de moléculas biológicamente activas que pueden realizar funciones fisiológicas definidas (Raposo and Stoorvogel, 2013). Se encuentra descrito en múltiples trabajos que poseer la capacidad de poder formar y liberar diferentes tipos de VEs provee a las células de ciertas ventajas adaptativas necesarias principalmente en microorganismos patógenos. Teniendo en cuenta las características ancestrales de *G. lamblia* en la evolución, es que resultó de gran interés indagar sobre las VEs liberadas por el parásito.

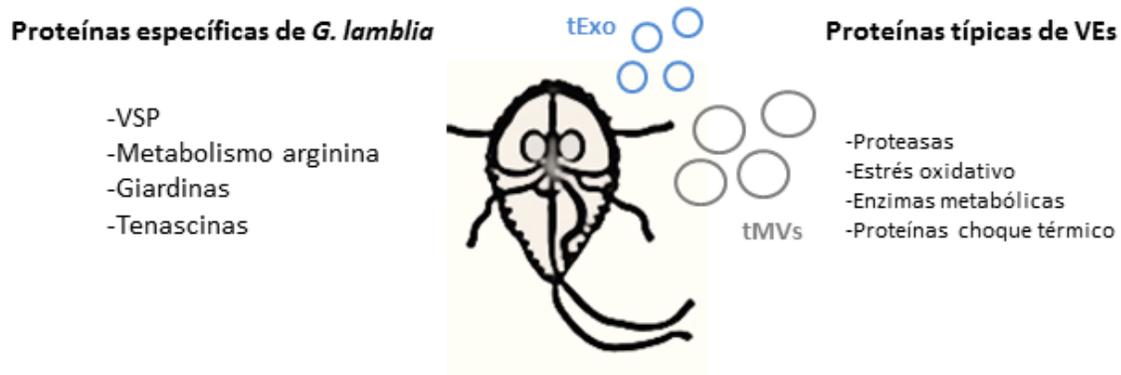
Así, el tema abordado en este trabajo de tesis resultó innovador, ya que hasta la fecha se sabía que *G. lamblia* contaba con una maquinaria ESCRT reducida, ausencia de MVBs típicos y de la mayoría de las proteínas Rabs presentes en mamíferos. Sin embargo, pudimos identificar y caracterizar diferentes tipos de VEs que el parásito libera al medio extracelular y, además, junto con los antecedentes ya conocidos, nos permite sugerir un modelo donde *G. lamblia* es capaz de llevar a cabo la biogénesis y liberación de exosomas.

En la **PARTE I** de resultados se describió que los ensamblaje A (WB/C6) y B (GS/H7) de *G. lamblia* liberan al medio extracelular vesículas de diferentes tamaños. En general, los primeros resultados extraídos del análisis proteómico de las VEs muestran que la mayoría de las proteínas secretadas a través de VEs en los ensamblajes A y B presentan proteínas comunes a las encontradas en las VEs de otras especies, lo que sugiere que este parásito tiene la capacidad de secretar VEs representativas. Como esperábamos, se encontraron además proteínas específicas de *G. lamblia* (**Figura 5.1**). Resta realizar un análisis funcional exhaustivo para determinar si alguna de estas proteínas se encuentra involucradas en el crecimiento, patogenicidad y diferenciación diferencial de cada ensamblaje.

### *Giardia lamblia* ensamblaje A (WB/C6)

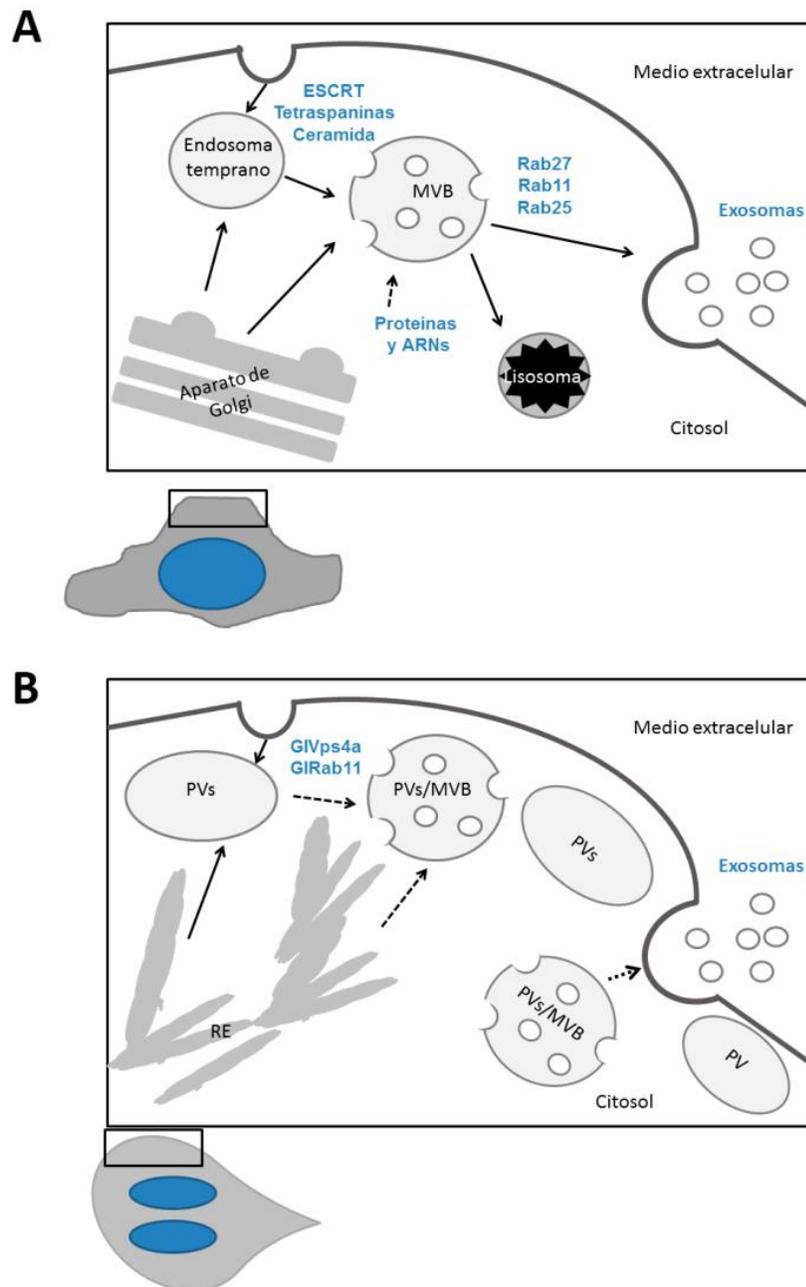


### *Giardia lamblia* ensamblaje B (GS/H7)



**Figura 5.1 Proteínas secretadas mediante VEs.** *G. lamblia* ensamblaje A (WB/C6) y B (GS/H7) liberan proteínas específicas en el medio de crecimiento *in vitro*. En ambos casos se liberan proteínas específicas de *G. lamblia* y proteínas que se encuentran conservadas en VEs de diferentes especies.

Por otra parte, los resultados presentados en la **PARTE II** nos permiten demostrar la participación de proteínas conservadas, tales como GIVps4a y la pequeña GTPasa GIRab11, en la biogénesis de las ILVs, tal como se muestra en el modelo propuesto de la **Figura 5.2**. Los resultados presentados en este capítulo forman parte de un trabajo publicado recientemente (Moyano et al., 2019).



**Figura 5.2 Formación de exosomas. (A)** En las células de mamíferos, los exosomas se originan en los MVBs, a partir de la vía endosómica. La formación de las ILVs en los MVBs parece requerir proteínas ESCRT, tetraspaninas y ceramida, mientras que se demostró que las proteínas Rabs están involucradas en la secreción de exosomas. **(B)** En los trofozoítos de *G. lamblia*, los exosomas parecen originarse en las PVs (Midlej et al., 2019), mientras que las proteínas GIVps4a y GIRab11 participan en la biogénesis.

## ANEXO I: Análisis espectrometría de masa ensamblaje A (WB/C6)

Nº de acceso	Descripción	MW [kDa]	# DTM	Péptido señal	Función	tMVs	tExo
GL50803_27266	[2Fe-2S] ferredoxin	14,5	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	
GL50803_6430	14-3-3 protein	28,6	0	Ausente	Señalización	X	X
GL50803_101805	2 cysteine membrane protein Group 1	82,5	1	Presente	Otras	X	X
GL50803_103454	2 cysteine membrane protein Group 1	79,4	1	Presente	Otras		X
GL50803_24880	2 cysteine membrane protein Group 2	98,8	1	Presente	Otras	X	X
GL50803_113987	2 cysteine membrane protein Group 3	86,1	1	Presente	Otras	X	
GL50803_6372	2 cysteine protein	56	1	Presente	Otras	X	X
GL50803_8822	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	65	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_16924	20S proteasome alpha subunit 1	27,3	0	Ausente	Proteólisis	X	
GL50803_11434	20S proteasome alpha subunit 2	27,4	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50803_14497	20S proteasome alpha subunit 3	26,7	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50803_15099	20S proteasome alpha subunit 4	23,2	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50803_2980	20S proteasome alpha subunit 5	26,7	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50803_7962	20S proteasome alpha subunit 6	28,2	0	Ausente	Proteólisis	X	
GL50803_11486	20S proteasome alpha subunit 7	31,8	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50803_4365	26S protease regulatory subunit 6A	55,9	0	Ausente	Proteólisis	X	
GL50803_21331	26S protease regulatory subunit 7	44,2	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50803_33166	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	135,8	0	Ausente	Proteólisis	X	
GL50803_91643	26S proteasome regulatory subunit, putative	147,5	0	Presente	Proteólisis	X	
GL50803_10885	4-alpha-glucanotransferase amylo-alpha-1,6-glucosidase	195,7	0	Ausente	Proteólisis	X	
GL50803_9088	4-methyl-5-thiazole monophosphate biosynthesis enzyme	19,6	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_20195	5-methylthioadenosine nucleosidase, S-adenosylhomocysteine nucleosidase	28,9	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_3643	70 kDa peptidylprolyl isomerase, putative	37,6	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_16867	AAA family ATPase	96,3	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_92223	ABC transporter family protein	105,5	7	Ausente	Transporte	X	
GL50803_16592	ABC transporter family protein	252,3	15	Ausente	Transporte	X	
GL50803_16575	ABC transporter family protein	120,3	6	Ausente	Transporte	X	
GL50803_21411	ABC transporter, ATP-binding protein	221,6	14	Presente	Transporte	X	X
GL50803_13608	Acetyl-CoA synthetase	78,1	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_8716	Acid phosphatase surE	44,9	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas		X
GL50803_17054	Acidic ribosomal protein P0	35	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_40817	Actin related protein	41,6	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_8726	Actin related protein	106,4	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_86511	Acyl-CoA synthetase	106,7	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_16667	Acyl-CoA synthetase	99,4	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_112885	Adenine phosphoribosyltransferase	19,4	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_90402	Adenylate kinase	21,3	0	Presente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_7009	Adenylate kinase	28,3	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_28234	Adenylate kinase	31,9	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_7789	ADP-ribosylation factor	21,8	0	Ausente	Unión	X	X

GL50803_12150	Alanine aminotransferase, putative	58,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_93358	Alcohol dehydrogenase	97,1	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_3861	Alcohol dehydrogenase 3 lateral transfer candidate	45,2	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_3593	Alcohol dehydrogenase lateral transfer candidate	44,8	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_13350	Alcohol dehydrogenase lateral transfer candidate	49	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_7260	Aldose reductase	35,4	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_9008	Aldose reductase	34,7	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_17304	Alpha adaptin	87	0	Ausente	Transporte	X	
GL50803_11654	Alpha-1 giardin	33,9	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_5649	Alpha-10 giardin	37,3	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_17153	Alpha-11 giardin	35	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_10073	Alpha-12 giardin	36,1	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_15097	Alpha-14 giardin	38,6	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_13996	Alpha-15 giardin	33,9	0	Ausente	Otras	X	
GL50803_15101	Alpha-17 giardin	34,6	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_10038	Alpha-18 giardin	32,3	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_4026	Alpha-19 giardin	47,8	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_7796	Alpha-2 giardin	33,9	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_11683	Alpha-3 giardin	33,3	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_7799	Alpha-4 giardin	33,6	0	Ausente	Otras	X	
GL50803_7797	Alpha-5 giardin	33,9	0	Ausente	Otras	X	
GL50803_14551	Alpha-6 giardin	33,1	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_103373	Alpha-7.1 giardin	42,9	0	Presente	Otras	X	X
GL50803_114787	Alpha-7.3 giardin	33	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_11649	Alpha-8 giardin	35,7	0	Ausente	Otras	X	
GL50803_103437	Alpha-9 giardin	33,8	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_10856	Alpha-snap	32,7	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_16521	Alpha-snap	32,4	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_17224	Alpha-SNAP, putative	33,2	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_112079	Alpha-tubulin	50,5	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_7909	Amino acid transporter family	61,7	11	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_91712	Amino acid transporter family	77,1	11	Ausente	Transporte	X	
GL50803_11299	Amino acid transporter, putative	63,9	10	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_8407	Aminoacyl-histidine dipeptidase	55,1	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_15832	Aminoacyl-histidine dipeptidase	56,6	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_13930	ARF3	20,4	0	Presente	Unión	X	
GL50803_112103	Arginine deiminase	64,1	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_10521	Arginyl-tRNA synthetase	70,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_13523	ARL protein, putative	27,3	0	Ausente	Unión		X
GL50803_7953	Arsenical pump-driving ATPase	39,5	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_91056	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	47,6	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_16519	AstB/chuR-related protein	42,2	0	Ausente	Otras	X	
GL50803_12807	ATP binding protein associated with cell differentiation, putative	20,8	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_2098	ATP-dependent RNA helicase p54, putative	48,4	0	Ausente	Unión	X	X

GL50803_10358	A-type flavoprotein lateral transfer candidate	46,6	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_114462	Axonemal p66.0	62,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_16202	Axoneme central apparatus protein	54,2	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_13475	Axoneme-associated protein GASP-180	236,2	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_137716	Axoneme-associated protein GASP-180	174,7	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_23235	Axoneme-associated protein GASP-180	104,7	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_16745	Axoneme-associated protein GASP-180	115,9	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_21423	Beta adaptin	122,8	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_136020	Beta tubulin	50	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_4812	Beta-giardin	30,9	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_17121	Bip	74,3	1	Presente	Transporte	X	X
GL50803_6184	Branched-chain amino acid aminotransferase lateral transfer candidate	39	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_13747	C4 group specific protein	21,9	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_16829	Calcineurin B subunit	21,7	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_13652	Calmodulin	18	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_5333	Calmodulin	17,3	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_104685	Caltractin	20,2	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_9117	CAMP-dependent protein kinase regulatory chain	50,7	0	Ausente	Señalización	X	X
GL50803_16453	Carbamate kinase	33,9	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_14019	Cathepsin B precursor	33	0	Presente	Proteólisis	X	X
GL50803_16779	Cathepsin B precursor	32,7	0	Presente	Proteólisis	X	
GL50803_16380	Cathepsin L precursor	61,8	0	Presente	Proteólisis	X	X
GL50803_14983	Cathepsin L precursor	65,1	0	Presente	Proteólisis	X	X
GL50803_92246	Cation-transporting ATPase 2, putative	151,8	7	Presente	Transporte	X	
GL50803_17413	CDC19	147,7	0	Ausente	Otras	X	
GL50803_5772	CDC72	47	0	Ausente	Otras	X	
GL50803_7259	CDP-diacylglycerol-glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase	32,3	2	Ausente	Enzimas metabólicas	X	
GL50803_6744	Centrin	18,7	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_15148	Chaperone protein dnaJ	67,3	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_17483	Chaperone protein dnaJ	37,2	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_9808	Chaperone protein DnaJ	45,1	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_9751	Chaperone protein dnaJ	39,6	1	Ausente	Unión	X	X
GL50803_42285	Ciliary dynein heavy chain 11	834,2	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_102108	Clathrin heavy chain	206,8	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_16707	Clusterin associated protein 1, putative	48,6	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_11953	Coatomer alpha subunit	139,2	0	Ausente	Transporte	X	
GL50803_9593	Coatomer beta' subunit	109,1	0	Ausente	Transporte	X	
GL50803_6170	Coatomer delta subunit	32,9	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_5603	Coatomer gamma subunit	105,2	0	Ausente	Transporte	X	
GL50803_14345	Coiled-coil protein	160,1	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_15591	Coiled-coil protein	185,9	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_3409	Coiled-coil protein	103,8	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_11867	Coiled-coil protein	47,8	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_40831	Coiled-coil protein	259,5	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_9515	Coiled-coil protein	150,3	0	Ausente	Unión	X	X

GL50803_113677	Coiled-coil protein	254,8	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_16199	Coiled-coil protein	126,4	0	Ausente	Otras	X	
GL50803_10167	Coiled-coil protein	132,9	0	Presente	Otras	X	X
GL50803_21662	Coiled-coil protein	218,3	0	Ausente	Otras	X	
GL50803_16332	Coiled-coil protein	196,3	0	Ausente	Otras	X	
GL50803_102248	Coiled-coil protein	115,5	0	Ausente	Otras	X	
GL50803_17249	Coiled-coil protein	190,4	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_17574	Coiled-coil protein	71,5	0	Ausente	Otras	X	
GL50803_91374	Coiled-coil protein	98,9	0	Ausente	Otras	X	
GL50803_15364	Coiled-coil protein	158	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_16342	Coiled-coil protein	186,3	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_42000	Coiled-coil protein	285,3	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_95653	Coiled-coil protein	91,5	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_8903	Copine I	29,1	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_29490	Copine I	30	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_17587	CTP synthase	68	1	Ausente	Enzimas metabólicas		X
GL50803_4507	CTP synthase/UTP-ammonia lyase	99,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_14225	CXC-rich protein	188,6	1	Presente	Otras	X	X
GL50803_2661	Cyclin-dependent kinases regulatory subunit	10,4	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50803_2101	Cytidine deaminase	14,4	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_88765	Cytosolic HSP70	71,6	0	Ausente	Plegamiento	X	X
GL50803_34684	DEAD box RNA helicase Vasa	50,1	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_17294	Degreening related gene dee76 protein	37,5	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_86676	Delta giardin	33,6	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_15535	Deoxyhypusine synthase, putative	43,8	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_17451	Deoxynucleoside kinase	29,2	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_15127	Deoxyribose-phosphate aldolase lateral transfer candidate	27,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_16200	Developmentally regulated GTP-binding protein 1	41,3	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_14566	Dipeptidyl-peptidase I precursor	59,9	1	Presente	Proteólisis	X	X
GL50803_8741	Dipeptidyl-peptidase I precursor	62,5	1	Presente	Proteólisis	X	X
GL50803_15190	DNA topoisomerase III	107	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_13832	D-tyrosyl-tRNA deacylase	19,9	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	
GL50803_4369	Dual specificity phosphatase Cdc25, putative	13,4	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50803_15112	Dual specificity phosphatase, catalytic	78,4	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_9270	Dual specificity protein phosphatase CDC14A	66,2	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_14373	Dynammin	79,5	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_15549	Dynein binding protein, putative	81,6	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_17265	Dynein heavy chain	301,9	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_93736	Dynein heavy chain	522,7	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_103059	Dynein heavy chain	273,9	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_17243	Dynein heavy chain	163,1	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_16804	Dynein heavy chain	261,8	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_17478	Dynein heavy chain	600,7	0	Presente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_101138	Dynein heavy chain	577,9	0	Ausente	Citoesqueleto	X	
GL50803_94440	Dynein heavy chain	629,6	0	Ausente	Citoesqueleto	X	

GL50803_8172	Dynein heavy chain	43,3	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_111950	Dynein heavy chain	570	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_40496	Dynein heavy chain	553,1	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_10538	Dynein heavy chain	88,3	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_100906	Dynein heavy chain, putative	622,6	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_10254	Dynein intermediate chain	88,3	0	Ausente	Citoesqueleto	X	
GL50803_33218	Dynein intermediate chain	83,8	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_6939	Dynein intermediate chain	70	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_9848	Dynein light chain	10,4	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_15124	Dynein light chain	11,3	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_4236	Dynein light chain	11,9	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_13575	Dynein light chain	12	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_7578	Dynein light chain	19,2	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_4463	Dynein light chain	20,9	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_14270	Dynein light chain	16,2	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_13273	Dynein light intermediate chain	26,9	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_16540	Dynein regulatory complex	54,2	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_15460	Dynein-like protein	52,5	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_7875	E04F6.2 like protein	27,5	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_15455	E04F6.2 like protein	27	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_14048	EB1	27,2	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_3256	EH domain binding protein epsin 2	45,2	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_113603	ELKS	103,4	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_112312	Elongation factor 1-alpha	49,1	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50803_12102	Elongation factor 1-gamma	45,2	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50803_17570	Elongation factor 2	99,6	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50803_7522	Elongation initiation factor 5C	46,9	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50803_24372	ENC6 protein	39,6	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	
GL50803_4349	Endothelin-converting enzyme 2	24,7	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_11118	Enolase	48,2	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_15204	ERP3	22,8	1	Presente	Transporte	X	
GL50803_17190	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1	51,1	0	Ausente	Translation	X	X
GL50803_8708	Eukaryotic Traducción initiation factor 1A	18,1	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50803_13943	Eukaryotic Traducción initiation factor 2 alpha subunit	38,1	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50803_91398	Eukaryotic Traducción initiation factor 2 beta subunit	37,1	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50803_15538	Eukaryotic Traducción initiation factor 5	38,2	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50803_14614	Eukaryotic Traducción initiation factor 5A	16,6	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50803_6633	Farnesyl diphosphate synthase	46,2	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_23888	FixW protein, putative	22,9	0	Presente	Otras	X	X
GL50803_6289	FixW protein, putative	14,9	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_10450	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	11,8	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_101339	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	23,8	0	Presente	Unión	X	X
GL50803_41512	Flagella associated protein	74	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_11043	Fructose-bisphosphate aldolase	35,2	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X

GL50803_6055	FtsJ-like protein	29,9	0	Ausente	Otras	X	
GL50803_17460	G1 to S phase transition protein 1, putative	51,3	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_3977	G2/mitotic-specific cyclin B	39,5	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_17230	Gamma giardin	35,6	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_114218	Gamma tubulin	54,1	0	Ausente	Otras	X	
GL50803_17090	Giardia trophozoite antigen GTA-1	20,7	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_15427	Giardia trophozoite antigen GTA-2	26,6	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_8826	Glucokinase	37,7	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_14651	Glucosamine 6-phosphate N-acetyltransferase	16,7	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_10829	Glucosamine-6-phosphate deaminase	28,8	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_8682	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	83	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_9115	Glucose-6-phosphate isomerase	64,5	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_7195	Glutamate synthase	98,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_6687	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	36,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_16125	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	118,8	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_16818	Glycine-, glutamate-, thienylcyclohexylpiperidine-binding protein	121,8	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_6226	Glycogen phosphorylase	104,8	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_15247	Grp94/Hsp90	99,8	0	Presente	Proteínas de folding	X	X
GL50803_104866	GTL3 aka MD0260	22,7	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_15869	GTP-binding nuclear protein RAN/TC4	25,4	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_17149	GTP-binding protein	57,3	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_7569	GTP-binding protein Sar1	21,2	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_114246	GTP-binding protein, putative	45,4	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_6436	Guanine phosphoribosyltransferase	26,3	1	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_7203	Guanylate kinase	23,7	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_9594	Heat shock 70kD protein binding protein	32,3	0	Ausente	Plegamiento	X	X
GL50803_17432	Heat shock protein 70	139,2	0	Presente	Plegamiento	X	X
GL50803_13864	Heat shock protein HSP 90-alpha	37	0	Ausente	Plegamiento	X	X
GL50803_98054	Heat shock protein HSP 90-alpha	43,4	0	Ausente	Plegamiento	X	X
GL50803_16412	Heat-shock protein, putative	94,7	0	Ausente	Plegamiento	X	X
GL50803_11540	Hexose Transporter	56,3	12	Presente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_27521	Histone H2A	13,9	0	Ausente	Otras	X	
GL50803_9148	H-SHIPPO 1	22,2	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_91354	H-SHIPPO 1	63,5	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_3042	Hybrid cluster protein lateral transfer candidate	62,5	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_15305	Hydroxyacylglutathione hydrolase	24,8	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_5012	hypothetical protein	42	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_13809	hypothetical protein	37,3	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_15251	hypothetical protein	32,5	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_29252	hypothetical protein	23,7	1	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_41212	hypothetical protein	149,2	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_13584	hypothetical protein	43,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_95787	hypothetical protein	146,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_1875	hypothetical protein	16	0	Ausente	Hipotética	X	X

GL50803_2201	hypothetical protein	27,7	0	Ausente	Hipotética		X
GL50803_12163	hypothetical protein	45,5	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_114674	Hypothetical protein	73	1	Presente	Hipotética	X	X
GL50803_16068	hypothetical protein	84,7	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_5927	hypothetical protein	38,4	1	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_2107	hypothetical protein	35,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_15546	hypothetical protein	29,2	0	Ausente	Traducción	X	
GL50803_15545	hypothetical protein	69,5	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_112893	hypothetical protein	26,4	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_7422	hypothetical protein	69,3	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_2010	hypothetical protein	24,9	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50803_2012	hypothetical protein	15,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_29327	hypothetical protein (VPS2)	22,8	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_14400	hypothetical protein	35,8	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_7242	hypothetical protein	27,2	3	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_7244	hypothetical protein	21,2	3	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_15216	hypothetical protein	114,5	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_15213	hypothetical protein	69,9	1	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_13467	hypothetical protein	35	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_32399	hypothetical protein	49,2	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_90425	hypothetical protein	57,3	10	Presente	Hipotética	X	X
GL50803_10836	hypothetical protein	21,2	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_113133	hypothetical protein	95,3	1	Presente	Hipotética	X	X
GL50803_22806	hypothetical protein	38,9	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_7751	hypothetical protein	118,4	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_8250	hypothetical protein	17,4	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_8049	hypothetical protein	55,2	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_40521	hypothetical protein	31,7	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_15888	hypothetical protein	68,2	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_3582	hypothetical protein	40,3	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_3581	hypothetical protein	14,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_3538	hypothetical protein	30	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_16588	hypothetical protein	11,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_22543	hypothetical protein	146,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_8854	hypothetical protein	70,1	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_16678	hypothetical protein	34,3	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_8865	hypothetical protein	46,5	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_16679	hypothetical protein	65,7	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_103878	hypothetical protein	305,3	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_24279	hypothetical protein	89,5	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_8528	hypothetical protein	56,8	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_17347	hypothetical protein	23,2	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_17342	hypothetical protein	72,4	12	Ausente	Transporte	X	
GL50803_13133	hypothetical protein	59,8	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_94117	hypothetical protein	240,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_37488	hypothetical protein	163,1	0	Ausente	Hipotética	X	X

GL50803_17334	hypothetical protein	87,9	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_17332	hypothetical protein	179,3	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_10181	hypothetical protein	85,2	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_17330	hypothetical protein	19	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_112258	hypothetical protein	248,6	0	Ausente	Señalización	X	
GL50803_33513	hypothetical protein	54,9	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_10572	hypothetical protein	35,2	1	Presente	Hipotética	X	
GL50803_9861	hypothetical protein	42,7	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_104139	hypothetical protein	56,7	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_7520	hypothetical protein	53,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_10221	hypothetical protein	37,9	2	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_8377	hypothetical protein	32,3	0	Presente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_5883	hypothetical protein	62,5	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_16926	hypothetical protein	56,8	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_13651	hypothetical protein	78,4	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_24485	hypothetical protein	42,1	0	Ausente	Unión		X
GL50803_10676	hypothetical protein	80,2	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_16966	hypothetical protein	512,7	2	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_41619	hypothetical protein	269,1	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_8394	hypothetical protein	9,4	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_15495	hypothetical protein	98,4	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_15499	hypothetical protein	48,8	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_17412	hypothetical protein	82,4	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_7566	hypothetical protein	31	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_7570	hypothetical protein	199,1	0	Presente	Hipotética	X	
GL50803_16424	hypothetical protein	29,7	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_11342	hypothetical protein	13,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_17403	hypothetical protein	174,2	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_17400	hypothetical protein	35,4	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_11321	hypothetical protein	171,8	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_2964	hypothetical protein	21,6	1	Presente	Señalización	X	
GL50803_13268	hypothetical protein	10,1	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_13269	hypothetical protein	39,5	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_17083	hypothetical protein	58,6	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_8348	hypothetical protein	22,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_97741	hypothetical protein	24,1	0	Ausente	Hipotética		X
GL50803_11380	hypothetical protein	52,1	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_9503	hypothetical protein	34,8	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_14972	hypothetical protein	120,2	1	Ausente	Unión	X	
GL50803_24451	hypothetical protein	15,5	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_9058	hypothetical protein	50,5	0	Ausente	Señalización		X
GL50803_14850	hypothetical protein	29,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_113673	hypothetical protein	179,8	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_93278	hypothetical protein	118,9	0	Ausente	Transporte	X	
GL50803_114199	hypothetical protein	33,7	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_8639	hypothetical protein	51,8	0	Ausente	Hipotética	X	

GL50803_17037	hypothetical protein	28,7	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_114210	hypothetical protein	113,9	1	Presente	Hipotética	X	
GL50803_4337	hypothetical protein	29,3	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_13603	hypothetical protein	23,4	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_87056	hypothetical protein	231,7	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_8942	hypothetical protein	29,7	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_8944	hypothetical protein	21,3	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_10813	hypothetical protein	258	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_10808	hypothetical protein	25,2	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_9612	hypothetical protein	46,9	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_23004	hypothetical protein	17,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_21342	hypothetical protein	31	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_12999	hypothetical protein	24,2	2	Presente	Hipotética	X	X
GL50803_5800	hypothetical protein	29,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_7966	hypothetical protein	63,9	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_37452	hypothetical protein	209,8	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_9134	hypothetical protein	270,7	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_11714	hypothetical protein	51,6	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_15483	hypothetical protein	42,4	8	Presente	Transporte	X	X
GL50803_11720	hypothetical protein	48,4	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_14877	hypothetical protein	54,4	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_6334	hypothetical protein	10,1	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_17388	hypothetical protein	186,2	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_6886	hypothetical protein	102,8	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_6896	hypothetical protein	31,3	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_8329	hypothetical protein (VPS25)	21,4	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_9098	hypothetical protein	52,3	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_10316	hypothetical protein	37	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_10315	hypothetical protein	25,1	1	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_5785	hypothetical protein	24,7	1	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_16935	hypothetical protein	93,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_15522	hypothetical protein	80,8	0	Ausente	Hipotética		X
GL50803_137746	hypothetical protein	61,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_24979	hypothetical protein	39,8	0	Presente	Otras	X	X
GL50803_11034	hypothetical protein	24,8	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_16039	hypothetical protein	96,4	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_10013	hypothetical protein	24,4	1	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_10016	hypothetical protein	35,3	0	Presente	Hipotética	X	X
GL50803_14583	hypothetical protein	20,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_14584	hypothetical protein	109,9	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_16596	hypothetical protein	66,9	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_6542	hypothetical protein	102,6	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_6752	hypothetical protein	15,1	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_42377	hypothetical protein	179,2	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_5768	hypothetical protein	40,7	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_95530	hypothetical protein	172,2	0	Ausente	Unión	X	

GL50803_7396	hypothetical protein	13,2	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_17312	hypothetical protein	73,1	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_16543	hypothetical protein	64,4	0	Presente	Hipotética	X	
GL50803_6439	hypothetical protein	20,9	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_137750	hypothetical protein	108,7	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_31339	hypothetical protein	20,7	2	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_4624	hypothetical protein	15,3	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_103709	hypothetical protein	94,7	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_6469	hypothetical protein	23,9	1	Presente	Hipotética	X	X
GL50803_12035	hypothetical protein	26,4	3	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_112112	hypothetical protein	136,2	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_37350	hypothetical protein	796,4	2	Ausente	Hipotética		X
GL50803_28699	hypothetical protein	26,7	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_4708	hypothetical protein	55,7	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_10882	hypothetical protein	33,1	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_10881	hypothetical protein	56,1	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_10879	hypothetical protein	92,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_10875	hypothetical protein	102,2	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_10868	hypothetical protein	22,8	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_10239	hypothetical protein	38,9	1	Presente	Hipotética	X	
GL50803_10232	hypothetical protein	73,1	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_6617	hypothetical protein	63,2	1	Presente	Hipotética	X	X
GL50803_16902	hypothetical protein	109,2	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_3920	hypothetical protein	81,5	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_13354	hypothetical protein	19,4	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_7323	hypothetical protein (VPS24)	22,9	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_7328	hypothetical protein	68,2	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_21628	hypothetical protein	42,4	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_14475	hypothetical protein	126,8	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_137753	hypothetical protein	163,1	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_114469	hypothetical protein	33,8	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_34160	Hypothetical protein	33	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_6185	hypothetical protein	24,8	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_6120	hypothetical protein	41,5	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_90044	hypothetical protein	131,6	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_14660	hypothetical protein	13,6	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_32509	hypothetical protein	116,1	1	Ausente	Unión	X	
GL50803_17627	hypothetical protein	143,7	0	Presente	Hipotética	X	
GL50803_113662	hypothetical protein	113,8	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_15334	hypothetical protein	194,9	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_8460	hypothetical protein	91,9	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_17617	hypothetical protein	28,9	3	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_11566	hypothetical protein	29,8	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_104984	hypothetical protein	29,5	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_9359	hypothetical protein	35	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_14963	hypothetical protein	96,7	0	Ausente	Hipotética	X	X

GL50803_33592	hypothetical protein	88,7	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_5186	hypothetical protein	202,2	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_13288	hypothetical protein	79,4	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_16773	hypothetical protein	94,7	0	Presente	Transporte	X	
GL50803_13143	hypothetical protein	28,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_10778	hypothetical protein	111,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_16998	hypothetical protein	69,1	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_10423	hypothetical protein	17,8	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_10422	hypothetical protein	24,2	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_96732	hypothetical protein	383,5	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_14045	hypothetical protein	35,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_94654	hypothetical protein	45,1	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_4149	hypothetical protein	49,5	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_3007	hypothetical protein	61,8	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_33685	hypothetical protein	115,8	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_16367	hypothetical protein	62	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_94658	hypothetical protein	59,1	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_101326	hypothetical protein	35,1	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_87039	hypothetical protein	340,9	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_8692	hypothetical protein	37,2	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_87577	hypothetical protein	33,3	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_16659	hypothetical protein	46,1	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_9916	hypothetical protein	24,4	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_15076	hypothetical protein	36,4	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_103125	hypothetical protein	191,9	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_40228	hypothetical protein	228,2	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_5810	hypothetical protein	14,5	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_5809	hypothetical protein	91,5	8	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_16404	hypothetical protein	17,3	1	Presente	Hipotética	X	X
GL50803_21943	hypothetical protein	17,1	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_13914	hypothetical protein	79,6	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_41927	hypothetical protein	19,2	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_10697	hypothetical protein	37,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_10708	hypothetical protein	74,5	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_6812	hypothetical protein	14,2	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_29078	hypothetical protein	35,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	
GL50803_14947	hypothetical protein	26,4	0	Ausente	Unión		X
GL50803_11354	hypothetical protein	30,1	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_14950	hypothetical protein	121,3	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_15454	hypothetical protein	53,1	0	Presente	Hipotética	X	
GL50803_90710	hypothetical protein	27,3	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_15446	hypothetical protein	38,4	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_15442	hypothetical protein	108,1	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_20551	hypothetical protein	16,2	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_115478	hypothetical protein	80,1	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_17352	hypothetical protein	48,9	0	Ausente	Hipotética	X	

GL50803_94762	hypothetical protein	122,5	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_4820	hypothetical protein	17,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_17362	hypothetical protein	189,8	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_7593	hypothetical protein	34,5	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_17367	hypothetical protein	20,8	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_13262	hypothetical protein	37,3	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_15605	hypothetical protein	42,8	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_29796	hypothetical protein	41,2	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_12224	hypothetical protein	35,1	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_15600	hypothetical protein	19,4	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_27918	hypothetical protein	10,3	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_17375	hypothetical protein	40,6	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_4692	hypothetical protein	26,8	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_101260	hypothetical protein	66,4	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_21318	hypothetical protein	99,3	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_115337	hypothetical protein	36,5	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_9780	hypothetical protein	26,5	0	Presente	Hipotética	X	X
GL50803_14689	hypothetical protein	98,4	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_13922	hypothetical protein	113,8	1	Presente	Hipotética	X	X
GL50803_16522	hypothetical protein	16,7	0	Ausente	Hipotética		X
GL50803_24947	hypothetical protein (Vps46b)	20,9	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_10939	hypothetical protein	42,8	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_1383	hypothetical protein	15,3	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_24043	hypothetical protein	121,8	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_41834	hypothetical protein	234,9	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_4239	hypothetical protein	11,5	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_13576	hypothetical protein	11	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_112787	hypothetical protein	206,9	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_11129	hypothetical protein	34,4	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_15347	hypothetical protein	113,1	1	Presente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_4323	hypothetical protein	42,3	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_11246	hypothetical protein	21,7	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_4595	hypothetical protein	170,2	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_12885	hypothetical protein	42,6	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_17255	hypothetical protein	73,7	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_94463	hypothetical protein	53,4	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_12830	hypothetical protein	28	6	Presente	Hipotética	X	X
GL50803_14509	hypothetical protein	94	0	Presente	Unión	X	
GL50803_14507	hypothetical protein	43,4	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_16504	hypothetical protein	97,3	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_8468	hypothetical protein	32,7	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_16507	hypothetical protein	98,6	1	Presente	Hipotética	X	X
GL50803_12109	hypothetical protein	45,5	2	Ausente	Enzimas metabólicas	X	
GL50803_96324	hypothetical protein	111,1	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_12105	hypothetical protein	69,8	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_6455	hypothetical protein	49	0	Ausente	Hipotética	X	

GL50803_6464	hypothetical protein	141,5	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_96264	hypothetical protein	31,7	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50803_10299	hypothetical protein	24,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_10303	hypothetical protein	44,4	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_104250	hypothetical protein	13,8	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_14318	hypothetical protein	28,2	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_2555	hypothetical protein	22,1	4	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_15573	hypothetical protein	81,7	0	Presente	Hipotética	X	
GL50803_17583	hypothetical protein	27,7	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_114921	hypothetical protein	224,2	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_86815	hypothetical protein	134,8	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_28336	hypothetical protein	32,8	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_7843	hypothetical protein	21,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_14567	hypothetical protein	23,1	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_3746	hypothetical protein	118,9	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_112870	hypothetical protein	13,8	0	Ausente	Unión		X
GL50803_8745	hypothetical protein	157,2	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_90122	hypothetical protein	282,7	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_17155	hypothetical protein	67,6	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_10027	hypothetical protein	28,1	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_134442	hypothetical protein	14,5	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_21201	hypothetical protein	29,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_16375	hypothetical protein	60,1	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_8410	hypothetical protein	30,2	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_22855	hypothetical protein	47,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_8405	hypothetical protein	47,6	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_16267	hypothetical protein	63,1	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_9045	hypothetical protein	37,6	0	Presente	Otras	X	
GL50803_14846	hypothetical protein	116,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_14458	Hypothetical protein	21,5	1	Presente	Hipotética	X	X
GL50803_7444	Hypothetical protein	41,1	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_15847	Hypothetical protein	28,7	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_16550	hypothetical protein	37,3	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_32730	hypothetical protein	187,7	0	Ausente	Proteólisis	X	
GL50803_16556	hypothetical protein	140,3	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_14241	hypothetical protein	153,5	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_6558	hypothetical protein	35,9	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_28962	hypothetical protein	33,5	1	Presente	Hipotética	X	X
GL50803_9807	hypothetical protein	154,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_6283	hypothetical protein	53,9	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_6377	hypothetical protein	92,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_113871	hypothetical protein	90,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_16054	hypothetical protein	23,5	1	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_16353	hypothetical protein	83,6	1	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_13323	hypothetical protein	92,2	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_3345	hypothetical protein	18	0	Ausente	Hipotética	X	X

GL50803_14704	hypothetical protein	110,1	0	Presente	Unión	X	X
GL50803_8426	hypothetical protein	97,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_103818	hypothetical protein	289,2	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_8770	hypothetical protein	28,6	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_16731	hypothetical protein	333,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_11105	hypothetical protein	65,4	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_17116	hypothetical protein	24,9	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_89828	hypothetical protein	83,9	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_16050	hypothetical protein	110	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_92760	hypothetical protein	54,7	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_6917	hypothetical protein	23,4	3	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_93294	hypothetical protein	138,9	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_17283	hypothetical protein	168,3	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_17278	hypothetical protein	33,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_3910	hypothetical protein	13,7	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_16471	hypothetical protein	87,3	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_137712	hypothetical protein	707,3	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_7207	hypothetical protein	120	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_33663	hypothetical protein	116,6	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_14921	hypothetical protein	54,8	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_24425	hypothetical protein	52,3	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_16996	hypothetical protein	46	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_13904	hypothetical protein	19,1	0	Presente	Unión	X	
GL50803_6709	hypothetical protein	57,6	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_6725	hypothetical protein	100,1	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_12941	hypothetical protein	29,3	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_92132	hypothetical protein	187	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_40369	hypothetical protein	157	0	Presente	Hipotética	X	
GL50803_112557	hypothetical protein	88,9	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_16973	hypothetical protein	59,2	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_135886	hypothetical protein	24	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_10889	hypothetical protein	26,8	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_15310	hypothetical protein	78,4	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_88556	hypothetical protein	36,5	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_3934	hypothetical protein	22,4	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_14874	hypothetical protein	21,4	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_9121	hypothetical protein	43,5	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_34701	hypothetical protein	222,8	3	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_15472	hypothetical protein (Vps46a)	20,4	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_11700	hypothetical protein	62,7	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_9238	hypothetical protein	113,2	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_4266	hypothetical protein	121,2	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_8727	hypothetical protein	124,4	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_1649	hypothetical protein	12,7	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_12741	hypothetical protein	15,3	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_7685	hypothetical protein	24,4	0	Ausente	Hipotética	X	

GL50803_3158	hypothetical protein	22,5	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_7891	hypothetical protein	65,6	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_15987	hypothetical protein	38,6	1	Ausente	Enzimas metabólicas	X	
GL50803_114497	hypothetical protein	115,7	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_2864	hypothetical protein	62	0	Presente	Hipotética	X	
GL50803_33629	hypothetical protein	40,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_13413	hypothetical protein	20,5	2	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_96570	hypothetical protein	175,3	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_16321	hypothetical protein	291,9	0	Ausente	Proteólisis	X	
GL50803_21474	hypothetical protein	181,7	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_7046	hypothetical protein	11,2	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_7233	hypothetical protein	47,1	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_32681	hypothetical protein	273,8	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_13945	hypothetical protein	37,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_17195	hypothetical protein	18,9	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_114751	hypothetical protein	202,1	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_15376	hypothetical protein	322,6	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_4447	hypothetical protein	29	1	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_9183	hypothetical protein	213,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_115159	hypothetical protein	72,2	1	Presente	Hipotética	X	
GL50803_14481	hypothetical protein	15,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_101278	hypothetical protein	149,7	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_4018	hypothetical protein	69,3	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_6048	hypothetical protein	50,3	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_137684	hypothetical protein	147,8	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_16768	hypothetical protein	354,4	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_16717	hypothetical protein	28,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_16720	hypothetical protein	96	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_16648	hypothetical protein	88,3	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_6535	hypothetical protein	12	0	HMM	Hipotética	X	
GL50803_16653	hypothetical protein	103,1	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_88960	hypothetical protein	29,2	4	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_3062	hypothetical protein	57,4	8	Presente	Hipotética		X
GL50803_21048	hypothetical protein	447,6	0	Ausente	Hipotética	X	O
GL50803_21110	hypothetical protein	27,1	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_9355	hypothetical protein	14,9	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_7791	hypothetical protein	146,1	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_16192	hypothetical protein	66,1	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_86468	hypothetical protein	33,7	1	Presente	Hipotética	X	X
GL50803_14390	hypothetical protein	172,5	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_7188	hypothetical protein	115,5	1	Presente	Hipotética	X	X
GL50803_6171	hypothetical protein	17,4	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_4590	hypothetical protein	30,8	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_2548	hypothetical protein	55	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_12800	hypothetical protein	42,7	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_15834	hypothetical protein	30	0	Ausente	Hipotética	X	

GL50803_25205	hypothetical protein	136,4	14	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_12867	hypothetical protein	60,7	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_13272	hypothetical protein	40,4	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_16237	hypothetical protein	76,8	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_114623	hypothetical protein	46,4	10	Presente	Hipotética	X	X
GL50803_16044	hypothetical protein	19,9	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50803_9157	hypothetical protein	30,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_13774	hypothetical protein	32,3	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_15240	hypothetical protein	46,4	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_10527	hypothetical protein	35,4	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_17468	hypothetical protein	35,8	0	Presente	Hipotética	X	X
GL50803_10524	hypothetical protein	27,3	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_8560	hypothetical protein	16,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_114777	hypothetical protein	72,7	12	Ausente	Transporte	X	
GL50803_94542	hypothetical protein	162	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_2833	hypothetical protein	27,8	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50803_113284	hypothetical protein	27,7	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_9349	hypothetical protein, similar to AMMECR1	21,8	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50803_3531	HZGJ	41,1	0	Ausente	Unión		X
GL50803_17251	IFT complex A	212,2	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_16547	IFT complex A	187,9	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_14713	IFT complex B	41,4	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_15428	IFT complex B	75,5	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_40995	IFT complex B	34,3	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_17105	IFT complex B	215,3	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_17223	IFT complex B	115	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_15106	Importin beta-3 subunit	127,6	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_9077	Inositol 5-phosphatase 4	124	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	
GL50803_17579	Inositol-3-phosphate synthase	59,9	2	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_16660	Intraflagellar transport particle protein IFT88	95,9	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_9750	Intraflagellar transport protein component IFT74/72	63,3	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_104173	Isoleucyl-tRNA synthetase	133,5	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	
GL50803_15054	Kelch repeat-containing protein	166,1	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_5643	Kinase	76,3	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas		X
GL50803_11364	Kinase, AGC AKT	65,9	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_8587	Kinase, AGC NDR	55	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_86444	Kinase, AGC PKA	46,6	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas		X
GL50803_11214	Kinase, AGC PKA	40,4	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50803_16034	Kinase, CAMK CAMKL	49,2	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_14661	Kinase, CAMK CAMKL	52	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50803_17566	Kinase, CAMK CAMKL	71,2	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_16235	Kinase, CAMK CAMKL	46,1	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_112076	Kinase, CDC7	189,9	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_7537	Kinase, CK1 Casein kinase	46,5	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_15397	Kinase, CMGC CDK	38,1	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X

GL50803_16802	Kinase, CMGC CDK	32,8	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_8037	Kinase, CMGC CDK	35,2	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_96616	Kinase, CMGC CDKL	36,3	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50803_92741	Kinase, CMGC CLK	50,8	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50803_17558	Kinase, CMGC DYRK	136,4	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_17625	Kinase, CMGC GSK	39,9	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_9116	Kinase, CMGC GSK	42,2	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_17563	Kinase, CMGC MAPK	43,9	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_22850	Kinase, CMGC MAPK	41,1	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_6700	Kinase, CMGC RCK	44,9	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50803_12223	Kinase, NAK	69,6	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_9658	Kinase, NEK	34,6	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_87677	Kinase, NEK	133,1	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50803_2483	Kinase, NEK	57,2	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_16967	Kinase, NEK	154,8	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_101534	Kinase, NEK	31,4	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_15409	Kinase, NEK	57	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_11390	Kinase, NEK	85,1	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_17084	Kinase, NEK	161,7	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50803_15953	Kinase, NEK	124,7	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_114307	Kinase, NEK	101,4	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_16272	Kinase, NEK	136,5	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_137733	Kinase, NEK	32,8	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_14742	Kinase, NEK	32,6	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_13215	Kinase, NEK	70,9	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_95593	Kinase, NEK	42,3	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_113553	Kinase, NEK	71,5	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_17231	Kinase, NEK	111,4	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_14835	Kinase, NEK	114,1	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_4912	Kinase, NEK	33,4	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_13981	Kinase, NEK	123	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50803_12148	Kinase, NEK	86,1	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_11554	Kinase, NEK	31,6	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_14934	Kinase, NEK	164,5	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50803_16824	Kinase, NEK	90,5	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_5375	Kinase, NEK	44,9	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_11311	Kinase, NEK	41,5	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_91220	Kinase, NEK	124,2	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50803_9421	Kinase, NEK	64,4	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_13921	Kinase, NEK	43,1	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_92498	Kinase, NEK	102,2	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_94927	Kinase, NEK	115	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50803_9870	Kinase, NEK	94,2	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50803_15049	Kinase, NEK	76	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50803_137719	Kinase, NEK	52,2	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50803_8152	Kinase, NEK	64,6	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X

GL50803_17069	Kinase, NEK	58,7	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_3957	Kinase, NEK	82	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas		X
GL50803_10893	Kinase, NEK	35,8	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_9196	Kinase, NEK	33,9	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_24321	Kinase, NEK	33,3	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_6680	Kinase, NEK	38,8	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_16460	Kinase, NEK	134	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_16279	Kinase, NEK	75,3	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50803_5346	Kinase, NEK	55,1	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_26199	Kinase, NEK	53	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_8445	Kinase, NEK	66,9	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50803_4977	Kinase, NEK-frag	44,9	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50803_15411	Kinase, NEK-frag	78	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_5489	Kinase, NEK-frag	61,3	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50803_16839	Kinase, NEK-frag	85,9	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50803_17578	Kinase, NEK-frag	112,6	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50803_7579	Kinase, NEK-frag	33,8	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas		X
GL50803_102034	Kinase, NEK-frag	108,1	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_15035	Kinase, NEK-like	59,2	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_104150	Kinase, PLK	77,1	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_8805	Kinase, SCY1	103,3	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_10609	Kinase, STE STE20	47	0	Presente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_2796	Kinase, STE STE20	64,2	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50803_15514	Kinase, STE STE20	58	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_22165	Kinase, STE STE20	39,5	0	Presente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_103838	Kinase, ULK	212,1	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50803_113456	Kinase, VPS15	233,9	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50803_16945	Kinesin-13	79,6	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_7874	Kinesin-16	87,9	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_17333	Kinesin-2	80,2	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_16456	Kinesin-2	72,6	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_112846	Kinesin-3	120,4	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_6262	Kinesin-3	121	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_102101	Kinesin-3	114,5	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_16425	Kinesin-5	116,4	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_102455	Kinesin-6	130,3	0	Ausente	Transporte	X	
GL50803_6404	Kinesin-9	84,1	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_114885	Kinesin-associated protein	86,2	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_86761	LEK1	79	0	Presente	Otras	X	X
GL50803_11684	Leucine-rich repeat protein	89	1	Presente	Otras	X	
GL50803_5795	Leucine-rich repeat protein 1 virus receptor protein	85,4	0	Presente	Otras	X	X
GL50803_113143	Lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein	467,2	0	Ausente	Otras	X	
GL50803_16595	Liver stage antigen-like protein	200,9	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_9062	Long chain fatty acid CoA ligase 5	94,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	
GL50803_21118	Long chain fatty acid CoA ligase 5	84,5	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X

GL50803_113892	Long chain fatty acid CoA ligase, putative	84,5	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_14004	Long-flagella protein, kinase, CMGC RCK	60,3	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_14456	Low molecular weight protein-tyrosine-phosphatase	17,7	0	Presente	Otras	X	
GL50803_24662	L-serine dehydratase	57	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_15090	L-serine dehydratase	56	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_16766	Lysyl-tRNA synthetase	65,9	0	Ausente	Traducción	X	
GL50803_12091	Macrophage migration inhibitory factor	12,4	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_17391	Maebi, putative	58,9	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_3331	Malate dehydrogenase	35,5	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_14285	Malic enzyme	61,5	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_8163	Manganese-dependent inorganic pyrophosphatase, putative	76,4	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_8074	Manganese-dependent inorganic pyrophosphatase, putative	76,1	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50803_13897	MCT-1 protein-like protein	26,4	0	Ausente	Unión		X
GL50803_16343	Median body protein	100,5	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_15078	Metal-dependent hydrolase related to alanyl-tRNA synthetase	42,9	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_8929	Metal-dependent phosphoesterases, putative	36,2	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_14392	Metallo-beta-lactamase superfamily protein	34,7	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_9508	Metalloprotease, insulinase family	131,4	0	Ausente	Proteólisis	X	
GL50803_93551	Metalloprotease, insulinase family	128,4	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50803_86600	Methionine aminopeptidase	47,1	1	Presente	Proteólisis	X	X
GL50803_4606	Methionyl-tRNA synthetase	24,7	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_9174	Microsomal signal peptidase 18 kDa subunit	24,4	1	Presente	Señalización	X	
GL50803_100955	Mitotic spindle checkpoint protein MAD2	22,5	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_11044	Mob1-like protein	24,5	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_14200	Molybdenum cofactor sulfurase	68,6	1	Ausente	Enzimas metabólicas	X	
GL50803_8917	Mu adaptin	48,4	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_115052	Multidrug resistance-associated protein 1	178,7	12	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_4204	MutT/nudix family protein	26,8	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_10858	MYG1 protein	40,8	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_9719	NADH oxidase	47	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_33769	NADH oxidase lateral transfer candidate	53,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_17150	NADPH oxidoreductase, putative	18,6	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_21942	NADP-specific glutamate dehydrogenase	49,7	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_16322	Neurogenic locus Notch protein precursor	63	0	Presente	Unión	X	X
GL50803_9038	Nicotinate phosphoribosyltransferase	69,6	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_15307	Nitroreductase family protein	19,6	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_22677	Nitroreductase Fd-NR2	28,5	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_4165	NOD3 protein, putative	110,9	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_112681	NSF	90,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_114776	NSF	89,5	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_4063	Nuclear LIM interactor-interacting factor 1	47,3	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_14905	Nuclear LIM interactor-interacting factor 1	30,5	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas		X
GL50803_14135	Nucleoside diphosphate kinase	43,1	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_11301	Nucleoside diphosphate kinase	16,8	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X

GL50803_10969	Nucleotide-binding protein 1	36,7	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_23357	NYD-SP28 protein	52,1	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_10311	Ornithine carbamoyltransferase	36,4	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_2452	Ornithine cyclodeaminase	33,9	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_94582	Ornithine decarboxylase	49,5	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_8855	P115, putative	104	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_5892	Pelo protein	44	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_17163	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor	18	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_17000	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor	21,2	0	Presente	Otras	X	X
GL50803_86440	Peptidyl-tRNA hydrolase	19	1	Presente	Otras	X	
GL50803_14521	Peroxiredoxin 1	22,5	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_15383	Peroxiredoxin 1	27,6	0	Presente	Otras	X	X
GL50803_15215	Phosphatase	35,3	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_14404	Phosphatase	42,2	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_17157	Phosphatase subunit gene g4-1	51,7	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50803_4357	Phosphatase, putative	72,3	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_16906	Phosphatidate cytidyltransferase	41,6	8	Ausente	Enzimas metabólicas	X	
GL50803_13890	Phosphatidyl synthase	37,6	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_4197	Phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform	39,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_7261	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, putative	42,7	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_2622	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, putative	32,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_14628	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, putative	61,7	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_10623	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	73,8	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_90872	Phosphoglycerate kinase	43,6	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_14841	Phosphoglycolate phosphatase	25,6	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_14546	Phosphoglycolate phosphatase	25,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas		X
GL50803_93548	Phospholipase B	62,7	0	Presente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_17277	Phospholipase B	65,6	0	Presente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_101810	Phospholipid-transporting ATPase IIB, putative	159,4	9	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_17254	Phosphomannomutase-2	73,9	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_11448	Phosphomannomutase-2	59	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_17538	Phosphoprotein phosphatase 2A regulatory subunit	85,5	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_95563	Phosphorylase B kinase gamma catalytic chain	160,5	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_10698	Phosphorylase B kinase gamma catalytic chain	85,2	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_10612	Phosphotyrosyl phosphatase activator protein, putative	36,1	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_32658	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 2	120,2	10	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_102438	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 2	85,3	10	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_5942	Polyadenylate-binding protein, putative	50	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_96670	Potassium-transporting ATPase alpha chain 1	147,9	8	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_7030	Prefoldin subunit 3, putative	21,8	0	Ausente	Plegamiento	X	X
GL50803_3417	Preimplantation protein 3	26,8	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_7306	Prenylated synaptobrevin/VAMP, putative	24	0	Ausente	Transporte		X

GL50803_2933	Programmed cell death protein-like protein	19,9	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_15983	Prolyl-tRNA synthetase	61	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_13127	Proteasome subunit beta type 1	28,4	0	Presente	Proteólisis	X	X
GL50803_3209	Proteasome subunit beta type 2	23,7	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50803_13756	Proteasome subunit beta type 3	23	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50803_1995	Proteasome subunit beta type 4 precursor	23,4	0	Presente	Proteólisis	X	X
GL50803_12949	Proteasome subunit beta type 5 precursor	32,3	0	Ausente	Proteólisis	X	
GL50803_27059	Proteasome subunit beta type 7 precursor	29,3	0	Ausente	Proteólisis	X	
GL50803_9824	Proteasome subunit beta type 9 precursor	24,1	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50803_17046	Protein 21.1	74,5	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_114671	Protein 21.1	69,4	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_32778	Protein 21.1	64,2	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_7414	Protein 21.1	40,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_8235	Protein 21.1	33,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_16220	Protein 21.1	71,1	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_14745	Protein 21.1	67,5	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_14800	Protein 21.1	43,7	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_7375	Protein 21.1	86,8	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_16435	Protein 21.1	77	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_113622	Protein 21.1	164	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_10219	Protein 21.1	159,1	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_14434	Protein 21.1	49,7	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_14679	Protein 21.1	54,1	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_101397	Protein 21.1	37,3	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_14485	Protein 21.1	39,9	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_16326	Protein 21.1	82,3	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_11499	Protein 21.1	31,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_21603	Protein 21.1	55,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_24842	Protein 21.1	201,3	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_7268	Protein 21.1	125,8	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_95192	Protein 21.1	124,3	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_17096	Protein 21.1	85,4	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_17097	Protein 21.1	162,9	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_103783	Protein 21.1	25,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_14133	Protein 21.1	28,2	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_24009	Protein 21.1	46,7	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_13766	Protein 21.1	92,9	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_6344	Protein 21.1	24,9	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_17608	Protein 21.1	61,9	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_5188	Protein 21.1	57,1	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_3760	Protein 21.1	50,1	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_40016	Protein 21.1	70,6	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_40014	Protein 21.1	119,4	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_10703	Protein 21.1	42	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_6081	Protein 21.1	132,4	0	Ausente	Unión	X	

GL50803_88369	Protein 21.1	92	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_4383	Protein 21.1	83,9	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_17551	Protein 21.1	118,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_14254	Protein 21.1	87,5	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_17568	Protein 21.1	59,8	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_102813	Protein 21.1	37	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_3903	Protein 21.1	160,6	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_7679	Protein 21.1	78,4	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_27925	Protein 21.1	87,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_17130	Protein 21.1	163,6	0	Ausente	Unión		X
GL50803_16227	Protein 21.1	54,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_17585	Protein 21.1	77,1	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_17586	Protein 21.1	52,5	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_17053	Protein 21.1	113,9	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_88245	Protein 21.1	134,4	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_88735	Protein 21.1	71,1	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_9030	Protein 21.1	36,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_24194	Protein 21.1	86,4	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_8174	Protein 21.1	93,9	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_16354	Protein 21.1	79,1	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_103810	Protein 21.1	206,3	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_103807	Protein 21.1	103,3	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_4767	Protein 21.1	33,3	1	Ausente	Unión	X	X
GL50803_16532	Protein 21.1	92,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_9720	Protein 21.1	112,8	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_14859	Protein 21.1	102,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_3475	Protein 21.1	127,8	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_92134	Protein 21.1	129,6	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_11165	Protein 21.1	82,3	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_11164	Protein 21.1	78,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_17060	Protein 21.1	66,2	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_10911	Protein 21.1	114,8	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_137703	Protein 21.1	56,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_23492	Protein 21.1	79,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_14872	Protein 21.1	137,3	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_40390	Protein 21.1	137,9	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_21505	Protein 21.1	95,2	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_5171	Protein 21.1	46,3	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_102023	Protein 21.1	91,9	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_24590	Protein 21.1	106,8	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_16915	Protein 21.1	84	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_12139	Protein 21.1	75,8	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_16891	Protein C21orf2	29,1	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_29487	Protein disulfide isomerase PDI1	25,8	0	Presente	Otras	X	X
GL50803_9413	Protein disulfide isomerase PDI2	50,4	1	Presente	Otras	X	X
GL50803_14670	Protein disulfide isomerase PDI3	12,7	0	Presente	Otras	X	X

GL50803_103713	Protein disulfide isomerase PDI4	40,3	0	Presente	Otras	X	X
GL50803_8064	Protein disulfide isomerase PDI5	14,6	1	Presente	Otras	X	X
GL50803_6724	Protein F17L21.10	13,4	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_87202	Protein F54C1.5	76,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_14730	Protein LRP16	40,3	0	Ausente	Transporte	X	
GL50803_16443	Protein phosphatase 2A B' regulatory subunit Wdb1	93,1	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_32312	Protein phosphatase 2C	56,7	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_9293	Protein phosphatase 2C-like protein	89,7	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_16180	Protein phosphatase methyltransferase-1	46,3	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50803_16567	Protein phosphatase PP2A regulatory subunit A	74,7	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_4079	Protein phosphatase PP2A regulatory subunit B	52,5	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_17567	Protein phosphatases PP1 regulatory subunit SDS22	66	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50803_91348	Purine nucleoside phosphorylase lateral transfer candidate	88,4	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_14993	Pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase alpha subunit	59,9	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_3206	Pyruvate kinase	70,7	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_17143	Pyruvate kinase	60,5	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_9909	Pyruvate, phosphate dikinase	97,6	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_114609	Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase	138,8	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_17063	Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase	131,7	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_11495	Rab GDI	52,6	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_1695	Rab11	23,6	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_9558	Rab1a	23,1	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_15567	Rab2a	23,7	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_16636	Rab2b	24,6	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_16979	Rab32, putative	30,2	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_8497	RabF	30	0	Ausente	Transporte	X	
GL50803_8496	Rac/Rho-like protein	23,9	0	Ausente	Señalización	X	X
GL50803_16450	Radial-spoke protein	34,2	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_16969	RAN binding protein 1	18,7	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_13452	Regulator of nonsense transcripts 1-like protein	147,4	0	Presente	Unión	X	
GL50803_13550	Rho GAP, putative	21,7	0	Ausente	Señalización	X	X
GL50803_15297	Ribokinase	36,6	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_27614	Ribose 5-phosphate isomerase	15,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_21750	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	40,6	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_10428	Ribosomal protein L10	24,2	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_1345	Ribosomal protein L10a	25	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_5593	Ribosomal protein L11	19,7	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_14938	Ribosomal protein L12	19,6	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_14622	Ribosomal protein L13	26,6	0	Presente	Ribosomales	X	
GL50803_11247	Ribosomal protein L13a	22,9	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_14091	Ribosomal protein L14	14,8	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_98056	Ribosomal protein L17	18,7	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_11950	Ribosomal protein L18	20,1	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_16387	Ribosomal protein L18a	20,6	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_16431	Ribosomal protein L19	23,1	0	Ausente	Ribosomales	X	X

GL50803_16086	Ribosomal protein L2	27	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_15520	Ribosomal protein L21	18,2	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_10091	Ribosomal protein L23	15,4	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_7870	Ribosomal protein L23A	16	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_19003	Ribosomal protein L24A	12	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_15046	Ribosomal protein L26	15,6	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_8462	Ribosomal protein L27	15,3	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_16310	Ribosomal protein L27a	17,1	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_16525	Ribosomal protein L3	42,6	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_14321	Ribosomal protein L30	11,7	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_16368	Ribosomal protein L31B	12,2	0	Ausente	Ribosomales	X	
GL50803_14049	Ribosomal protein L32	15,9	0	Ausente	Ribosomales	X	
GL50803_6133	Ribosomal protein L35	17,4	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_5947	Ribosomal protein L35a	13,9	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_5517	Ribosomal protein L37a	10,5	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_17547	Ribosomal protein L4	35	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_17395	Ribosomal protein L5	33,9	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_19436	Ribosomal protein L7	27	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_17244	Ribosomal protein L7a	25,4	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_17056	Ribosomal protein L9	20,8	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_17337	Ribosomal protein P1B	11,8	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_10919	Ribosomal protein S10B	15,4	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_14827	Ribosomal protein S11	18,1	0	Ausente	Ribosomales	X	
GL50803_33862	Ribosomal protein S12	14,3	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_16652	Ribosomal protein S13	17,6	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_7878	Ribosomal protein S14	15,7	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_15228	Ribosomal protein S15A	14,7	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_4652	Ribosomal protein S16	17,6	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_6135	Ribosomal protein S17	15,7	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_15551	Ribosomal protein S18	17,5	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_8118	Ribosomal protein S2	26,7	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_6022	Ribosomal protein S20	14	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_7082	Ribosomal protein S21	9,7	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_14699	Ribosomal protein S23	15,9	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_10367	Ribosomal protein S24	14,8	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_17364	Ribosomal protein S26	12,8	0	Ausente	Ribosomales	X	
GL50803_7999	Ribosomal protein S3	24,7	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_16265	Ribosomal protein S3a	28,3	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_11359	Ribosomal protein S4	30,4	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_12981	Ribosomal protein S5	21	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_14620	Ribosomal protein S6	28	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_14329	Ribosomal protein S7	21,7	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_5845	Ribosomal protein S8	19,4	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_4547	Ribosomal protein S9	21,6	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_7766	Ribosomal protein SA	28,1	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50803_10324	Ribulose-phosphate 3-epimerase	25,7	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X

GL50803_7662	RNase L inhibitor	75	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_23602	RTCB PROTEIN	64,8	0	Ausente	Otras	X	
GL50803_5659	S-adenosylmethionine synthetase	48,8	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	
GL50803_4410	SALP-1	29,8	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_13528	Sec1 vATPase	71,6	0	Ausente	Transporte	X	
GL50803_137698	Sec13	31,4	0	Ausente	Transporte	X	
GL50803_2562	Sec31	109,7	0	Presente	Transporte	X	
GL50803_5744	Sec61-alpha	54,1	9	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_3896	Sec61-gamma	7,9	1	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_15214	Ser/Thr phosphatase	35,5	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_7439	Ser/Thr phosphatase 2A, 65kDa reg sub A	71,7	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_11740	Ser/Thr phosphatase 2C, putative	39,1	0	Presente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_5010	Ser/Thr phosphatase PP2A-2 catalytic subunit	39,8	0	Presente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_15410	Ser/Thr protein kinase	31,7	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_14568	Ser/Thr protein phosphatase PP1-alpha 2 catalytic subunit	37,1	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_15871	Serine peptidase, putative	53,3	0	Presente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50803_10711	Serine/Threonine protein phosphatase	36,4	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_2053	Serine/threonine protein phosphatase 4	35	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_2198	Serine/threonine protein phosphatase 5	56,9	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_7588	Serine/threonine protein phosphatase 7	47,3	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_14545	Serine/threonine protein phosphatase PP1 isozyme 7	36,9	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50803_14311	Serine/threonine protein phosphatase PP-X isozyme 2	38,3	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50803_3313	Serine-pyruvate aminotransferase	41,9	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_4653	Serpin 1	38,8	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_101501	Seryl-tRNA synthetase	51,7	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_8044	Seven transmembrane protein 1	35,1	7	Ausente	Otras	X	X
GL50803_5328	Sigma adaptin	16,8	0	Ausente	Transporte	X	
GL50803_8916	Signal recognition particle 68kDa	67,6	0	Ausente	Señalización	X	
GL50803_14856	Signal recognition particle receptor	62,7	0	Ausente	Señalización	X	
GL50803_16263	Sjogren's syndrome nuclear autoantigen 1-like protein	12	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_101906	SKD1 protein	49,7	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_7287	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein	31,6	0	Presente	Unión	X	X
GL50803_17465	SMC4-like protein	160,5	0	Ausente	Unión		X
GL50803_6408	SnRNP Sm-like protein, putative	13,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_94322	Spastin	123,4	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_12046	SPEF1-like protein	27,1	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_16500	Sperm-associated WD-repeat protein	78,9	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_96399	Spindle pole body protein, putative	182,6	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_21444	Spindle pole protein, putative	66	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_16013	Spindle pole protein, putative	59,9	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_7031	Spindle pole protein, putative	109,2	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_13372	Spindle pole protein, putative	55,2	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_24537	Spindle pole protein, putative	58,9	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_24122	Spindle pole protein, putative	74,9	0	Ausente	Citoesqueleto	X	
GL50803_17055	Spindle pole protein, putative	62,2	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X

GL50803_33660	Spindle pole protein, putative	103,9	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_14895	Spindle pole protein, putative	72,1	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50803_27310	Stress-induced-phosphoprotein 1	65,3	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_91480	STU2-like protein	187,7	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_14469	Synaptobrevin-like protein	26,3	2	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_3869	Syntaxin 16	30,8	1	Ausente	Transporte	X	
GL50803_96994	Syntaxin 1A	34,8	1	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_7309	Syntaxin-like protein 1	32,5	1	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_9825	TBP-interacting protein TIP49	51,4	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_17565	TBP-interacting protein TIP49	52,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_91919	TCP-1 chaperonin subunit alpha	59,2	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_17482	TCP-1 chaperonin subunit alpha	56,3	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_11397	TCP-1 chaperonin subunit beta	56,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_11992	TCP-1 chaperonin subunit epsilon	61,2	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_16124	TCP-1 chaperonin subunit eta	64,7	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_17411	TCP-1 chaperonin subunit gamma	61,5	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_13500	TCP-1 chaperonin subunit theta	60,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_10231	TCP-1 chaperonin subunit zeta	60,9	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_16934	Tetratricopeptide repeat protein	155,1	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_9827	Thioredoxin reductase	33,8	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_12108	Threonine dehydratase lateral transfer candidate	104	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	
GL50803_13998	Threonyl-tRNA synthetase	79	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_10843	Thymus-specific serine protease precursor	58,4	0	Presente	Proteólisis	X	X
GL50803_16893	Tip elongation aberrant protein 1	102,1	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_137603	TMP52	52,3	1	Presente	Otras	X	
GL50803_16795	Topoisomerase II	57	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_16568	Transcription factor, putative	105,1	0	Ausente	Proteólisis	X	
GL50803_16817	Transglutaminase/protease, putative	52,4	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50803_8524	Transitional endoplasmic reticulum A	47,1	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_9704	Transketolase	77,5	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_13561	Traducción elongation factor	24,7	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50803_7990	Traducción elongation factor	19,9	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50803_2970	Traducción initiation factor 2 gamma subunit	52,3	0	Ausente	Traducción	X	
GL50803_14606	Traducción initiation factor 6	26,8	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50803_10255	Traducción initiation factor eIF-4A, putative	43,2	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50803_480	Traducción initiation inhibitor	12,9	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50803_93275	Traducción activator GCN1	315,2	0	Ausente	Traducción	X	
GL50803_6242	Traducciónally controlled tumor protein-like protein	17,4	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_17571	Trichohyalin	116,3	0	Ausente	Otras	X	
GL50803_32375	Trichohyalin	156,2	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_93938	Triosephosphate isomerase, cytosolic	27,9	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_11100	TRP domain containing protein	200,7	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_3032	Tryptophanyl-tRNA synthetase	48,2	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_87817	Tubby superfamily protein	169,3	0	Ausente	Proteólisis	X	
GL50803_14787	Type II inositol-1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase precursor	80,5	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X

GL50803_7296	U2 small nuclear ribonucleoprotein A', putative	20,8	0	Ausente	Unión	X	
GL50803_7110	Ubiquitin	9,3	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50803_14460	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 4	93	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50803_3994	Ubiquitin fusion degradation protein 1	35,2	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50803_15270	Ubiquitin protein, putative	55,6	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50803_10661	Ubiquitin-conjugating enzyme E1	121,3	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50803_3978	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa	17,6	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50803_15252	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa 3	20,3	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50803_9779	UPL-1	34,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_6563	Uracil phosphoribosyltransferase	23,2	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_8217	Uridine kinase	66	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	
GL50803_16549	Uridine kinase	77,2	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	
GL50803_17536	UsoAp	49,3	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_29307	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	49,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50803_7532	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A	71,5	0	Ausente	Vacuolar	X	X
GL50803_12216	Vacuolar ATP synthase subunit B	54,7	0	Ausente	Vacuolar	X	X
GL50803_87058	Vacuolar ATP synthase subunit C	55,6	0	Ausente	Vacuolar	X	X
GL50803_13000	Vacuolar ATP synthase subunit d	39,5	0	Ausente	Vacuolar	X	X
GL50803_3678	Vacuolar ATP synthase subunit D	29,5	0	Ausente	Vacuolar	X	X
GL50803_14961	Vacuolar ATP synthase subunit H	59,4	0	Ausente	Vacuolar	X	X
GL50803_100864	Vacuolar protein sorting 26, putative	57,3	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_103855	Vacuolar protein sorting 29	48,3	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_23833	Vacuolar protein sorting 35	87,4	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_18470	Vacuolar proton-ATPase subunit, putative	104,1	6	Ausente	Vacuolar	X	
GL50803_8367	VATPase	15,4	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50803_9489	V-SNARE	26,1	1	Ausente	Transporte	X	
GL50803_38901	VSP	7,2	1	Ausente	Otras	X	X
GL50803_137612	VSP	89,5	1	Presente	Otras	X	X
GL50803_11521	VSP	64,1	1	Presente	Otras	X	X
GL50803_33279	VSP	75,9	1	Presente	Otras		X
GL50803_101765	VSP	71,9	1	Presente	Otras	X	X
GL50803_137740	VSP	46,4	1	Ausente	Otras	X	X
GL50803_137606	VSP	88,9	1	Ausente	Otras	X	X
GL50803_40630	VSP	17	1	Ausente	Otras		X
GL50803_112801	VSP	76,4	1	Presente	Otras	X	X
GL50803_137618	VSP	88,6	1	Ausente	Otras	X	X
GL50803_116477	VSP	76,1	1	Presente	Otras	X	X
GL50803_137707	VSP	60,3	1	Presente	Otras		X
GL50803_137617	VSP	75,5	1	Presente	Otras	X	X
GL50803_13194	VSP AS8	63	1	Presente	Otras	X	X
GL50803_137613	VSP with INR	40,5	1	Presente	Otras	X	X
GL50803_115797	VSP with INR	70,2	1	Presente	Otras	X	X
GL50803_112208	VSP with INR	60,5	1	Presente	Otras	X	X
GL50803_113439	VSP with INR	73,8	1	Presente	Otras	X	X
GL50803_113450	VSP with INR	74,8	1	Presente	Otras	X	X

GL50803_113797	VSP with INR	72,5	1	Presente	Otras	X	X
GL50803_119707	VSP with INR	69,8	1	Presente	Otras	X	
GL50803_101074	VSP with INR	76,7	1	Presente	Otras	X	X
GL50803_16501	VSP with INR	70,8	1	Presente	Otras	X	X
GL50803_14586	VSP with INR	75,5	1	Presente	Otras	X	X
GL50803_11470	VSP with INR	69,2	1	Ausente	Otras	X	X
GL50803_15218	WD-40 repeat protein	83,7	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_15956	WD-40 repeat protein	67,2	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_7807	WD-40 repeat protein	59,7	0	Ausente	Unión		X
GL50803_10822	WD-40 repeat protein family	38,5	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_16709	WD-repeat membrane protein	213,3	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_10429	Wos2 protein	20,8	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_17327	Xaa-Pro dipeptidase	49,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50803_33037	Zinc finger domain protein	62,2	0	Ausente	Otras	X	
GL50803_95895	ZipA	68,1	0	Ausente	Otras		X
GL50803_16811	ZipA	91,8	0	Ausente	Otras	X	X
GL50803_8842	ZPR1	52,4	0	Ausente	Unión	X	X

## ANEXO I: Análisis espectrometría de masa ensamblaje B (GS/H7)

N° de acceso	Descripción	MW [kDa]	# DTM	Peptido señal	Función	tMVs	tExo
GL50581_2925	14-3-3 protein	28,6	0	Ausente	Señalización	X	X
GL50581_353	2 cysteine membrane protein Group 1	170,3	1	Presente	Otras	X	
GL50581_727	2 cysteine membrane protein Group 1	73,1	1	Presente	Otras	X	
GL50581_670	2 cysteine membrane protein Group 2	98,9	1	Presente	Otras	X	
GL50581_3457	2 cysteine protein	74,1	1	Ausente	Otras	X	X
GL50581_2768	2 cysteine protein	36,9	1	Ausente	Otras	X	X
GL50581_3638	2 cysteine protein	55,8	1	Presente	Otras	X	
GL50581_2437	2 cysteine protein	71,7	1	Presente	Otras	X	
GL50581_945	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	65	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_1555	20S proteasome alpha subunit 1	27,2	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50581_2225	20S proteasome alpha subunit 2	27,5	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50581_2414	20S proteasome alpha subunit 3	26,7	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50581_2467	20S proteasome alpha subunit 4	23,3	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50581_1859	20S proteasome alpha subunit 5	26,8	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50581_969	20S proteasome alpha subunit 6	28,3	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50581_4001	20S proteasome alpha subunit 7	29,5	0	Ausente	Proteólisis	X	
GL50581_3669	26S protease regulatory subunit 7	44,1	0	Ausente	Proteólisis	X	
GL50581_1561	4-alpha-glucanotransferase, amylo-alpha-1,6-glucosidase	196	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_203	4-methyl-5-thiazole monophosphate biosynthesis enzyme	19,6	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_4069	5'-AMP-activated protein kinase, gamma-1 subunit	39,5	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	
GL50581_587	5'-methylthioadenosine nucleosidase, S-adenosylhomocysteine nucleosidase	28,8	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_4317	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	52,2	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_614	70 kDa peptidylprolyl isomerase, putative	37,7	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_3697	AAA family ATPase	96,3	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_2335	ABC transporter family protein	119,6	6	Ausente	Transporte	X	
GL50581_2323	ABC transporter family protein	123,8	8	Ausente	Transporte	X	
GL50581_4562	ABC transporter, ATP-binding protein	221,2	13	Presente	Transporte	X	X
GL50581_1757	ABC transporter, ATP-binding protein, putative	231,9	14	Presente	Transporte		X
GL50581_1568	Acetyl-CoA synthetase	76,6	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_370	Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3b precursor	49,6	0	Presente	Señalización	X	X
GL50581_1271	Acidic ribosomal protein P0	35,1	0	Ausente	Ribosomal	X	X
GL50581_3124	Actin related protein	106,6	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50581_16	Actin related protein	41,7	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50581_2507	Acyl-CoA synthetase	98,8	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_2965	Adenine phosphoribosyltransferase	19,4	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_2190	Adenylate kinase	32,1	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_3791	Adenylate kinase	28,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_3933	Adenylate kinase	21,2	0	Presente	Enzimas metabólicas	X	
GL50581_1483	ADP-ribosylation factor	21,8	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_2957	Alanine aminotransferase, putative	58,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_499	Alanine aminotransferase, putative	53	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	
GL50581_1499	Alanyl dipeptidyl peptidase	80,4	0	Presente	Enzimas metabólicas	X	X

GL50581_2060	Alanyl dipeptidyl peptidase	86,8	0	Presente	Enzimas metabólicas	X	
GL50581_2728	Alcohol dehydrogenase 3 lateral transfer candidate	45,2	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_1580	Alcohol dehydrogenase lateral transfer candidate	45,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_396	Alcohol dehydrogenase lateral transfer candidate	44,5	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_954	Aldose reductase	34,9	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_4007	Aldose reductase	35,2	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_3397	Alpha adaptin	87,1	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_2475	Alpha-10 giardin	37,1	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_2473	Alpha-11 giardin	35	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_4146	Alpha-14 giardin	38,6	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_2474	Alpha-15 giardin	33,9	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_2463	Alpha-17 giardin	34,8	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_2462	Alpha-18 giardin	32,3	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_1059	Alpha-19 giardin	50,3	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_1672	Alpha-2 giardin	33,9	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_2495	Alpha-2 giardin	23,5	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_4264	Alpha-3 giardin	33,4	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_1670	Alpha-6 giardin	33,3	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_2198	Alpha-9 giardin	34	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_722	Alpha-snap	33,1	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_354	Alpha-snap	32,5	0	Ausente	Unión	X	
GL50581_1865	Alpha-SNAP, putative	33,2	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_1380	Alpha-tubulin	50,5	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50581_3507	Amino acid Transporter, putative	64,3	10	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_2286	Aminoacyl-histidine dipeptidase	55,2	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50581_3080	Aminoacyl-histidine dipeptidase	54,6	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_2752	ARF GAP	45,7	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_2277	ARF3	20,5	0	Presente	Unión	X	
GL50581_1575	Arginine deiminase	64,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_3753	Arginyl-tRNA synthetase	70,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_129	ARL protein, putative	27	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_1298	ARL1	19,9	0	Ausente	Proteína de unión	X	X
GL50581_3815	Arsenical pump-driving ATPase	39,4	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_2893	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	47,6	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_1550	Aspartyl-tRNA synthetase	62,5	0	Ausente	Unión	X	
GL50581_265	ATP binding protein associated with cell differentiation, putative	20,8	0	Ausente	Otras	X	
GL50581_2400	ATP/GTP binding protein, putative	51,8	0	Ausente	Unión	X	
GL50581_3621	ATP-dependent RNA helicase p47, putative	50	0	Ausente	Unión	X	
GL50581_3010	ATP-dependent RNA helicase p54, putative	48,3	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_3100	ATP-dependent RNA helicase-like protein	73,4	0	Ausente	Unión	X	
GL50581_1626	A-type flavoprotein lateral transfer candidate	46,4	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_769	Axonemal p66.0	62,4	0	Ausente	Unión	X	
GL50581_3967	Axoneme central apparatus protein	54,2	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_3367	Axoneme-associated protein GASP-180	172,6	0	Ausente	Unión	X	X

GL50581_422	Axoneme-associated protein GASP-180	115,6	0	ausente	Unión	X	X
GL50581_2237	Axoneme-associated protein GASP-180	103,9	0	ausente	Unión	X	X
GL50581_4388	Axoneme-associated protein GASP-180	236,9	0	ausente	Unión	X	X
GL50581_981	Bet3-like protein	18,1	0	ausente	Transporte	X	X
GL50581_4548	Beta adaptin	123,8	0	ausente	Transporte	X	X
GL50581_2741	Beta-giardin	30,9	0	ausente	Otras	X	X
GL50581_3283	Bip	74,4	1	Presente	Transporte	X	X
GL50581_4524	Branched-chain amino acid aminotransferase lateral transfer candidate	39,2	0	ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_383	C4 group specific protein	22,3	0	ausente	Otras	X	X
GL50581_1525	Calcineurin B subunit	21,8	0	ausente	Unión	X	
GL50581_2793	Calmodulin	17,3	0	ausente	Unión	X	X
GL50581_3112	Caltractin	20,2	0	ausente	Unión	X	X
GL50581_1446	CAMP-dependent protein kinase regulatory chain	50,6	0	ausente	Señalización	X	X
GL50581_2343	Carbamate kinase	33,9	0	ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_3552	Casein kinase II beta chain	25,9	0	ausente	Señalización	X	X
GL50581_78	Cathepsin B precursor	32,8	0	Presente	Proteólisis	X	X
GL50581_2946	Cathepsin B precursor	32,1	0	Presente	Proteólisis	X	
GL50581_438	Cathepsin B precursor	34	0	Presente	Proteólisis	X	
GL50581_4331	Cathepsin L precursor	64,6	0	Presente	Proteólisis	X	X
GL50581_4332	Cathepsin L precursor	61,9	0	Presente	Proteólisis	X	
GL50581_474	CDC72	47,2	0	ausente	Otras	X	
GL50581_4006	CDP-diaclyglycerol-glycerol-3- phosphate 3-phosphatidyltransferase	30,8	3	ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_4229	Centrin	18,7	0	ausente	Unión	X	X
GL50581_3107	Chaperone protein DnaJ	44,7	0	ausente	Plegamiento	X	X
GL50581_3858	Chaperone protein dnaJ	67	0	ausente	Unión	X	X
GL50581_4490	Chaperone protein dnaJ	37,3	0	ausente	Unión	X	X
GL50581_1542	Chaperone protein dnaJ	40,8	0	Presente	Plegamiento	X	
GL50581_2432	Chaperone protein dnaJ	39,2	1	Ausente	Plegamiento	X	
GL50581_3576	Chaperone protein DnaK HSP70	70,9	0	Ausente	Plegamiento	X	
GL50581_3972	Chaperonin 60	57,3	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_585	Clathrin heavy chain	207,6	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_4002	Clusterin associated protein 1, putative	49,1	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_1195	Coatomer beta' subunit	109,6	0	Ausente	Transporte	X	
GL50581_3824	Coatomer delta subunit	32,8	0	Ausente	Transporte	X	
GL50581_685	Coiled-coil protein	186,6	0	Ausente	Otras	X	
GL50581_3768	Coiled-coil protein	30,2	0	Ausente	Otras	X	
GL50581_615	Coiled-coil protein	190,4	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_2504	Coiled-coil protein	133,4	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_2563	Coiled-coil protein	149,2	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_418	Coiled-coil protein	73,8	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasa	X	X
GL50581_3260	Coiled-coil protein	142,1	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_1073	Coiled-coil protein	177	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_3871	Coiled-coil protein	148,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_3075	Coiled-coil protein	63,2	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_1023	Coiled-coil protein	47,8	0	Ausente	Otras	X	X

GL50581_2063	Coiled-coil protein	103,8	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_2052	Coiled-coil protein	91,5	0	Ausente	Otras	X	
GL50581_3336	Copine	7,1	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_1282	Copine I	29,2	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_1547	Copine I	30	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_3536	Copper-transporting P-type ATPase	194,4	9	Ausente	Unión		X
GL50581_2652	CTP synthase/UTP-ammonia lyase	99,2	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_3236	CXC-rich protein	187	1	Presente	Otras	X	X
GL50581_1540	Cyclin 2 related protein, putative	35,3	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_3484	Cyclin-dependent kinases regulatory subunit	10,4	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_3589	Cysteine desulfurase	47,5	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	
GL50581_3526	Cysteinyl-tRNA synthetase	73,3	0	Ausente	Unión	X	
GL50581_1228	Cytidine deaminase	14,5	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_2353	Cytosolic HSP70	71,6	0	Ausente	Plegamiento	X	X
GL50581_3622	DEAD box RNA helicase Vasa	73	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_2444	Degreening related gene dee76 protein	37,7	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_3174	Delta giardin	30,7	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_338	Deoxyhypusine synthase, putative	43,5	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_4543	Deoxynucleoside kinase	16,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_937	Deoxyribose-phosphate aldolase	27,7	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_3962	Developmentally regulated GTP-binding protein 1	41,3	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_3606	Dipeptidyl-peptidase I precursor	62,4	1	Presente	Proteólisis	X	X
GL50581_1260	Dipeptidyl-peptidase I precursor	59,6	1	Presente	Proteólisis	X	X
GL50581_3800	Dual specificity phosphatase Cdc25, putative	13,1	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50581_3623	Dual specificity phosphatase, catalytic	76,9	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas		X
GL50581_241	Dual specificity protein phosphatase CDC14A	66	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_1962	Dynamin	79,7	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_1210	Dynein binding protein, putative	81,6	0	Ausente	Unión	X	
GL50581_3664	Dynein heavy chain	629,4	0	Ausente	Citoesqueleto		X
GL50581_4038	Dynein heavy chain	261,7	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50581_705	Dynein heavy chain	553,2	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50581_2837	Dynein heavy chain	302,1	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50581_415	Dynein heavy chain	274,3	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50581_3789	Dynein heavy chain	492,3	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50581_2424	Dynein heavy chain	155,7	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50581_4245	Dynein heavy chain	570,3	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50581_3742	Dynein heavy chain	82,8	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50581_2320	Dynein heavy chain	43,3	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50581_1860	Dynein intermediate chain	83,7	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50581_1601	Dynein intermediate chain	70	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50581_2834	Dynein light chain	10,4	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50581_3016	Dynein light chain	20,9	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50581_2800	Dynein light chain	11,3	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50581_3682	Dynein light chain	10,9	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50581_2666	Dynein light chain	19,2	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X

GL50581_72	Dynein light chain	12,1	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50581_71	Dynein light chain	11,9	0	Ausente	Citoesqueleto	X	
GL50581_3471	Dynein light intermediate chain	26,9	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50581_2208	Dynein regulatory complex	54,1	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50581_2203	Dynein-like protein	51,6	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50581_1407	E04F6.2 like protein	27	0	Ausente	Unión	X	
GL50581_1467	E04F6.2 like protein	27,5	0	Ausente	Unión	X	
GL50581_3522	EB1	26,7	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_49	EH domain binding protein epsin 2	45,8	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_413	Elongation factor 1-alpha	49,1	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50581_1508	Elongation factor 1-gamma	45,2	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50581_1765	Elongation factor 2	99,6	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50581_996	Elongation initiation factor 5C	47	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50581_951	Endothelin-converting enzyme 2	15,3	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_4371	Enolase	48,1	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_4071	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1	51,2	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50581_3652	Eukaryotic Traducción initiation factor 1A	18	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50581_55	Eukaryotic Traducción initiation factor 2 alpha subunit	38	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50581_333	Eukaryotic Traducción initiation factor 5	38,3	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50581_1977	Eukaryotic Traducción initiation factor 5A	16,6	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50581_3281	Farnesyl diphosphate synthase	46,2	0	Ausente	Enzimas metabólicas		X
GL50581_4021	Fe-hydrogenase-1	52,4	0	Ausente	Otras	X	
GL50581_3056	FixW protein, putative	23,1	0	Presente	Otras	X	X
GL50581_4194	FixW protein, putative	15	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_2531	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	11,8	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_4472	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	39	0	Ausente	Unión	X	
GL50581_3593	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	23,9	0	Presente	Unión	X	
GL50581_1489	Flagella associated protein	73,9	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50581_4115	Fructose-bisphosphate aldolase	35,1	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_4558	G1 to S phase transition protein 1, putative	51,8	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_4532	Gamma giardin	35,6	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_3956	Gamma tubulin	51,9	0	Ausente	Citoesqueleto	X	
GL50581_1587	Giardia trophozoite antigen GTA-1	20,7	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_4027	Giardia trophozoite antigen GTA-2	25,3	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_943	Glucokinase	37,4	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_4318	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	83,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_1444	Glucose-6-phosphate isomerase	64	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_3819	Glutamate synthase	98,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	
GL50581_1225	Glutaredoxin-related protein	21,8	0	Presente	Enzimas metabólicas	X	
GL50581_521	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	36,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_2252	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	119	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_4196	Glycine-, glutamate-, thienylcyclohexylpiperidine-binding protein	122	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_1415	Glycogen phosphorylase	104,6	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X

GL50581_1905	Glycogen synthase, putative	80,1	0	Ausente	Enzimas metabólicas		X
GL50581_2717	Glycyl-tRNA synthetase	69,5	0	Ausente	Señalización	X	
GL50581_3772	Golgi/cell cycle associated protein, putative	52,9	0	Ausente	Unión	X	
GL50581_1516	Gp49, putative	50,1	1	Presente	Señalización	X	
GL50581_4468	Grp94/Hsp90	98,8	0	Presente	Plegamiento	X	X
GL50581_2747	GTP-binding nuclear protein RAN/TC4	25,4	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_2668	GTP-binding protein	55,4	0	Ausente	Unión	X	
GL50581_2996	GTP-binding protein Sar1	21,2	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_489	GTP-binding protein, putative	45,5	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_3805	Guanine phosphoribosyltransferase	26,5	1	Ausente	Enzimas metabólicas		X
GL50581_1005	HAM1 protein	21,4	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_635	Heat shock protein 70	138,5	0	Presente	Plegamiento	X	
GL50581_2330	Heat shock protein HSP 90-alpha	37	0	Ausente	Plegamiento	X	X
GL50581_2256	Heat shock protein HSP 90-alpha	42,8	0	Ausente	Plegamiento	X	X
GL50581_1929	Heat-shock protein, putative	94,7	0	Ausente	Plegamiento	X	X
GL50581_4029	Hexose Transporter	57,6	12	Presente	Transporte	X	X
GL50581_3389	Histidyl-tRNA synthetase	105,6	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50581_3602	Histone H2A	13,8	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_3007	Histone H2B	14,6	0	Ausente	Otras	X	
GL50581_4513	Histone H3	16,3	0	Ausente	Otras	X	
GL50581_988	Histone H4	11,1	0	Ausente	Otras	X	
GL50581_2708	Hydroxyacylglutathione hydrolase	24,7	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_3070	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	53,4	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_4422	Hypothetical protein	240,9	0	Ausente	Hipotética		X
GL50581_4445	Hypothetical protein	180,6	0	Ausente	Hipotética		X
GL50581_436	Hypothetical protein	707,3	0	Ausente	Hipotética		X
GL50581_1377	Hypothetical protein	322,1	0	Ausente	Hipotética		X
GL50581_2274	Hypothetical protein	67,5	0	Ausente	Hipotética		X
GL50581_3821	Hypothetical protein	171,1	0	Ausente	Hipotética		X
GL50581_2191	Hypothetical protein	162	0	Ausente	Unión		X
GL50581_1472	Hypothetical protein	115,6	0	Ausente	Unión		X
GL50581_3987	Hypothetical protein	153	0	Ausente	Hipotética		X
GL50581_40	Hypothetical protein	180,9	0	Ausente	Hipotética		X
GL50581_1117	Hypothetical protein	152,8	0	Ausente	Unión		X
GL50581_3610	Hypothetical protein	157,1	0	Ausente	Hipotética		X
GL50581_1125	Hypothetical protein	188,3	0	Ausente	Proteólisis		X
GL50581_3903	Hypothetical protein	131,1	0	Ausente	Hipotética		X
GL50581_2163	Hypothetical protein	188,6	0	Ausente	Hipotética		X
GL50581_1160	Hypothetical protein	89	0	Ausente	Unión		X
GL50581_2869	Hypothetical protein	122,3	0	Ausente	Unión		X
GL50581_327	Hypothetical protein	224,6	1	Ausente	Hipotética		X
GL50581_2567	Hypothetical protein	146,1	0	Ausente	Hipotética		X
GL50581_1619	Hypothetical protein	116,7	0	Ausente	Hipotética		X
GL50581_4427	Hypothetical protein	254,1	0	Ausente	Hipotética		X
GL50581_2405	Hypothetical protein	202,2	0	Ausente	Hipotética		X

GL50581_2952	Hypothetical protein	13,9	0	Ausente	Hipotética		X
GL50581_1379	Hypothetical protein	200,3	0	Ausente	Hipotética		X
GL50581_2683	Hypothetical protein	196,1	0	Ausente	Hipotética		X
GL50581_174	Hypothetical protein	186,7	0	Ausente	Hipotética		X
GL50581_1069	Hypothetical protein	45,5	0	Ausente	Hipotética		X
GL50581_976	Hypothetical protein	210,9	0	Ausente	Hipotética		X
GL50581_3390	Hypothetical protein	121,4	0	Ausente	Hipotética		X
GL50581_3784	Hypothetical protein	83,2	10	Ausente	Hipotética		X
GL50581_867	Hypothetical protein	121,3	0	Ausente	Hipotética		X
GL50581_3696	Hypothetical protein	113,1	1	Presente	Enzimas metabólicas		X
GL50581_857	Hypothetical protein	20,5	0	Ausente	Hipotética		X
GL50581_1311	Hypothetical protein	381,4	0	Ausente	Hipotética		X
GL50581_4065	Hypothetical protein	221,4	0	Ausente	Unión		X
GL50581_2570	Hypothetical protein	94,5	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_1155	Hypothetical protein	97,2	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_881	Hypothetical protein	214	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_693	Hypothetical protein	149,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_3318	Hypothetical protein	35,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_4212	Hypothetical protein	103,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_2394	Hypothetical protein	42,1	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_2967	Hypothetical protein	69,3	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_1997	Hypothetical protein	24,3	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_3698	Reg Vps4	34,1	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_4015	Hypothetical protein	51	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_59	Hypothetical protein	18,9	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_2103	Hypothetical protein	83,9	1	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_3341	Hypothetical protein	42,3	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_1750	Hypothetical protein	92,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_1848	Hypothetical protein	48,8	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_2758	Hypothetical protein	146,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_4420	Hypothetical protein	72,9	12	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_1952	Hypothetical protein	21,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_210	Hypothetical protein	33,5	1	Presente	Hipotética	X	X
GL50581_4133	Hypothetical protein	14,5	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_3890	Hypothetical protein	53,6	11	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_757	Hypothetical protein	80,2	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_1231	VPS2	23	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_3659	Hypothetical protein	73,8	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_4313	Hypothetical protein	37,2	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_1748	Hypothetical protein	53,8	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_2651	Vps24	22,8	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_2588	Vps25	21,3	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_297	Hypothetical protein	62,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_1559	Hypothetical protein	33,2	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_1558	Hypothetical protein	56,3	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_2564	Hypothetical protein	43,6	0	Ausente	Hipotética	X	X

GL50581_4499	Hypothetical protein	30	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_1402	Vps22	27,2	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_3935	Hypothetical protein	43	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_1424	Hypothetical protein	49,5	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_1522	Hypothetical protein	26,2	0	Presente	Hipotética	X	X
GL50581_3951	Hypothetical protein	95,4	1	Presente	Hipotética	X	X
GL50581_1609	Hypothetical protein	14,9	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_712	Hypothetical protein	21,2	3	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_1326	Hypothetical protein	41,1	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_2294	Hypothetical protein	110,8	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_3566	Hypothetical protein	34,7	0	Presente	Hipotética	X	X
GL50581_1150	Hypothetical protein	97,9	1	Presente	Hipotética	X	X
GL50581_2436	Hypothetical protein	96,1	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_2067	Hypothetical protein	119,3	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_3581	Hypothetical protein	113,4	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_1349	Hypothetical protein	30,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_1807	Hypothetical protein	89,8	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_261	Hypothetical protein	93,8	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_2613	Hypothetical protein	30	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_4347	Hypothetical protein	55	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_1838	Hypothetical protein	10,4	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_823	Hypothetical protein	29	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_1751	Hypothetical protein	90,8	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_897	Hypothetical protein	11,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_553	Hypothetical protein	41,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_1102	Hypothetical protein	75,2	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_3106	Hypothetical protein	154,2	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_266	Hypothetical protein	27,3	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_3153	Hypothetical protein	93,9	0	Presente	Transporte	X	X
GL50581_1363	Hypothetical protein	14,2	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50581_1512	Hypothetical protein	45,6	3	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_3308	Hypothetical protein	33,3	1	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_1056	Hypothetical protein	186	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_1933	Hypothetical protein	36,2	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_2012	Hypothetical protein	23,4	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_3478	Hypothetical protein	30,2	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_3142	Hypothetical protein	27,9	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_492	Hypothetical protein	80,7	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_665	Hypothetical protein	25	1	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_1781	Hypothetical protein	43,3	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_2574	Hypothetical protein	29,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_1224	Hypothetical protein	14,4	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_305	Hypothetical protein	76,1	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_4523	Hypothetical protein	24,7	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_3528	Hypothetical protein	34,7	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_3387	Hypothetical protein	17,5	0	Ausente	Hipotética	X	X

GL50581_45	Hypothetical protein	47,3	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_3760	Hypothetical protein	16,8	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_3477	Hypothetical protein	137,2	13	Ausente	Otras	X	X
GL50581_3199	Hypothetical protein	22,1	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_661	Hypothetical protein	14	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_3354	Hypothetical protein	36,4	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_3102	Hypothetical protein	33,5	1	Presente	Hipotética	X	X
GL50581_3476	Hypothetical protein	60,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_3134	Hypothetical protein	15,2	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_4143	Hypothetical protein	52,5	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_461	Hypothetical protein	12,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_1463	Hypothetical protein	62,2	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_786	Hypothetical protein	17,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_3792	Hypothetical protein	85,5	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_913	Hypothetical protein	19,9	1	Presente	Hipotética	X	X
GL50581_681	Hypothetical protein	15,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_2088	Hypothetical protein	97,5	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_1330	Hypothetical protein	28,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_4495	Hypothetical protein	78,3	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_2812	Hypothetical protein	41,8	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_2978	Hypothetical protein	26,5	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_1222	Hypothetical protein	24,3	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_2576	Hypothetical protein	50,5	0	Ausente	Señalización	X	X
GL50581_4303	Hypothetical protein	24,3	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_4162	Hypothetical protein	13,5	0	Ausente	Plegamiento	X	X
GL50581_4139	Hypothetical protein	8,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_3192	Hypothetical protein	28,6	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_2165	Hypothetical protein	34,6	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_4297	Hypothetical protein	36,3	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_3453	Hypothetical protein	22,9	3	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_1694	Hypothetical protein	32,7	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_472	Hypothetical protein	40,5	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_714	Hypothetical protein	27,5	3	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_1206	Hypothetical protein	29,4	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50581_2458	Hypothetical protein	21,4	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_1316	Hypothetical protein	16,8	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_3179	Hypothetical protein	40,3	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_1913	Hypothetical protein	17,4	1	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_1253	Hypothetical protein	75,3	10	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_3422	Hypothetical protein	30,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_278	Hypothetical protein	14,7	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_3826	Hypothetical protein	17,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_3909	Hypothetical protein	11,3	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_631	Hypothetical protein	19,3	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_3228	Hypothetical protein	24,1	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_2776	Hypothetical protein	28,1	6	Presente	Hipotética	X	X

GL50581_1989	Hypothetical protein	269,5	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_3295	Hypothetical protein	41,7	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_434	Hypothetical protein	18,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_4172	Hypothetical protein	48,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_1950	Hypothetical protein	20,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_2763	Hypothetical protein	20,3	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_2867	Hypothetical protein	30	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_364	Hypothetical protein	114,2	1	Presente	Hipotética	X	X
GL50581_1488	Hypothetical protein	85	10	Presente	Hipotética	X	X
GL50581_586	Hypothetical protein	35,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_316	Hypothetical protein	44,9	0	Presente	Hipotética	X	X
GL50581_4401	Hypothetical protein	23	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_2999	Hypothetical protein	27,2	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_352	Hypothetical protein	16,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_1392	Hypothetical protein	30,2	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_4322	Hypothetical protein	35,2	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_3986	Hypothetical protein	33,6	1	Ausente	Unión	X	X
GL50581_2773	Hypothetical protein	53,1	10	Presente	Hipotética	X	X
GL50581_4081	Hypothetical protein	24,7	1	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_66	Hypothetical protein	15,4	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_4045	Hypothetical protein	29,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_927	Hypothetical protein	14,1	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_3077	Hypothetical protein	47,7	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_4493	Hypothetical protein	13,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_3563	Hypothetical protein	24,3	1	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_3608	Hypothetical protein	13,8	0	Ausente	Plegamiento	X	X
GL50581_2814	Hypothetical protein	36,7	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_3165	Hypothetical protein	35,5	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_3133	Hypothetical protein	12,8	0	Ausente	Plegamiento	X	X
GL50581_1879	Hypothetical protein	21,9	2	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_2395	Hypothetical protein	68,3	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_2385	Hypothetical protein	42,5	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_1202	Hypothetical protein	80,4	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_1131	Hypothetical protein	37,9	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_1449	Hypothetical protein	43,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_3312	Hypothetical protein	31,4	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_998	Hypothetical protein	53,7	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_2366	Hypothetical protein	51,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_1883	Hypothetical protein	26	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_4528	Hypothetical protein	20,5	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_628	Hypothetical protein	26,4	3	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_3849	Hypothetical protein	63,2	1	Presente	Hipotética	X	
GL50581_1740	Hypothetical protein	53,8	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50581_1709	Hypothetical protein	30	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50581_1510	Hypothetical protein	69,6	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50581_320	Hypothetical protein	50,1	0	Ausente	Hipotética	X	

GL50581_3881	Hypothetical protein	35,1	0	Ausente	Hipotética	X
GL50581_1016	Hypothetical protein	69,2	0	Ausente	Hipotética	X
GL50581_4228	Hypothetical protein	88,4	0	Ausente	Hipotética	X
GL50581_902	Hypothetical protein	56,4	1	Presente	Otras	X
GL50581_912	Hypothetical protein	32,4	0	Ausente	Hipotética	X
GL50581_4483	Hypothetical protein	59,2	0	Ausente	Hipotética	X
GL50581_372	Hypothetical protein	98,7	0	Presente	Unión	X
GL50581_4121	Hypothetical protein	25,3	0	Ausente	Hipotética	X
GL50581_2517	Hypothetical protein	35	0	Ausente	Hipotética	X
GL50581_1623	Hypothetical protein	37,1	0	Presente	Otras	X
GL50581_390	Hypothetical protein	34,4	0	Ausente	Hipotética	X
GL50581_92	Hypothetical protein	27,9	0	Ausente	Hipotética	X
GL50581_552	Hypothetical protein	20,5	2	Ausente	Hipotética	X
GL50581_2092	Hypothetical protein	109,3	0	Presente	Unión	X
GL50581_2501	Hypothetical protein	25,2	0	Ausente	Hipotética	X
GL50581_1976	Hypothetical protein	110,5	0	Ausente	Unión	X
GL50581_431	Hypothetical protein	120,4	0	Ausente	Unión	X
GL50581_4049	Hypothetical protein	20,6	0	Ausente	Hipotética	X
GL50581_2895	Hypothetical protein	28,8	3	Ausente	Hipotética	X
GL50581_1772	Hypothetical protein	41	0	Ausente	Hipotética	X
GL50581_2367	Hypothetical protein	45,1	0	Ausente	Hipotética	X
GL50581_1548	Hypothetical protein	23,1	0	Ausente	Transporte	X
GL50581_4361	Hypothetical protein	24,9	0	Ausente	Unión	X
GL50581_1450	Hypothetical protein	21,5	0	Ausente	Hipotética	X
GL50581_1863	Hypothetical protein	62,1	0	Ausente	Unión	X
GL50581_209	Hypothetical protein	84,5	1	Presente	Hipotética	X
GL50581_594	Hypothetical protein	26,8	1	Presente	Hipotética	X
GL50581_4261	Vps46a	20,2	0	Ausente	Transporte	X
GL50581_3375	Hypothetical protein	27,5	0	Ausente	Hipotética	X
GL50581_207	Hypothetical protein	65,5	0	Ausente	Hipotética	X
GL50581_735	Hypothetical protein	71	0	Ausente	Otras	X
GL50581_4535	Hypothetical protein	39	0	Ausente	Hipotética	X
GL50581_3412	Hypothetical protein	19,4	0	Ausente	Hipotética	X
GL50581_115	Hypothetical protein	45,4	0	Ausente	Hipotética	X
GL50581_3750	Hypothetical protein	28,3	0	Ausente	Hipotética	X
GL50581_3857	Hypothetical protein	72,9	0	Ausente	Hipotética	X
GL50581_676	Hypothetical protein	71,9	1	Presente	Hipotética	X
GL50581_4060	Hypothetical protein	14,2	1	Presente	Hipotética	X
GL50581_3357	Hypothetical protein	26,8	0	Ausente	Hipotética	X
GL50581_300	Hypothetical protein	56,9	0	Ausente	Hipotética	X
GL50581_2098	Hypothetical protein	91,7	0	Ausente	Hipotética	X
GL50581_3990	Hypothetical protein	92,4	1	Ausente	Hipotética	X
GL50581_169	Hypothetical protein	24,7	0	Ausente	Hipotética	X
GL50581_4128	Hypothetical protein	25,3	0	Ausente	Unión	X
GL50581_277	Hypothetical protein	40,3	0	Ausente	Hipotética	X
GL50581_4079	Hypothetical protein	93,6	0	Ausente	Hipotética	X

GL50581_2872	Hypothetical protein	30,8	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50581_3807	Hypothetical protein	20,8	0	Ausente	Unión	X	
GL50581_2262	Hypothetical protein	99,6	0	Presente	Hipotética	X	
GL50581_1302	Hypothetical protein	54,3	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50581_3946	Hypothetical protein	34,7	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50581_236	Hypothetical protein	36,6	0	Ausente	Unión	X	
GL50581_3973	Hypothetical protein	28,7	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50581_1337	Hypothetical protein	22,1	4	Ausente	Hipotética	X	
GL50581_2496	Hypothetical protein	106,9	1	Ausente	Hipotética	X	
GL50581_1266	Hypothetical protein	44,1	1	Presente	Hipotética	X	
GL50581_1727	Hypothetical protein	17,1	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50581_4377	Hypothetical protein	90	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50581_2453	Hypothetical protein	158,9	2	Presente	Hipotética	X	
GL50581_1110	Hypothetical protein	37,7	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50581_3424	Hypothetical protein	28,3	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50581_2445	Hypothetical protein	66,7	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50581_3306	Hypothetical protein	34,9	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50581_3580	Hypothetical protein	19,5	0	Ausente	Hipotética	X	
GL50581_2606	Hypothetical protein, similar to AMMECR1	21,6	0	Ausente	Hipotética	X	X
GL50581_612	IFT complex A	212,5	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_2933	IFT complex B	215,2	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_4028	IFT complex B	75,8	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_1870	IFT complex B	114,9	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_2899	IFT complex B	41,7	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_3539	IFT complex B	35,2	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_314	IgE-dependent histamine-releasing factor, putative	17,4	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_1866	Importin beta-3 subunit	127,6	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_3472	Inosine-uridine nucleoside N-ribohydrolase	40,1	2	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_1886	Inositol-3-phosphate synthase	59,4	2	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_4308	Intraflagellar transport particle protein IFT88	93,1	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_2433	Intraflagellar transport protein component IFT74/72	62,3	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_400	Kinase	76	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_4507	Kinase, AGC AKT	66,1	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_122	Kinase, AGC MAST	168,4	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas		X
GL50581_2450	Kinase, AGC NDR	54,9	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_2179	Kinase, AGC PKA	46,5	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_1371	Kinase, AGC PKA	40,5	1	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_3468	Kinase, CAMK CAMKL	38,3	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_1774	Kinase, CAMK CAMKL	71,3	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_2727	Kinase, CAMK CAMKL	49	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_1956	Kinase, CAMK CAMKL	51,9	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_2723	Kinase, CDC7	189,2	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_4031	Kinase, CMGC CDK	32,8	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_1980	Kinase, CMGC CDK	35,2	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_1544	Kinase, CMGC CDK	38,2	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X

GL50581_224	Kinase, CMGC CDKL	60,5	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50581_3599	Kinase, CMGC CK2	52,8	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50581_2235	Kinase, CMGC CLK	50,7	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50581_1063	Kinase, CMGC DYRK	97	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_1789	Kinase, CMGC DYRK	136,7	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50581_2637	Kinase, CMGC GSK	39,9	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_1780	Kinase, CMGC MAPK	43,9	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_1382	Kinase, CMGC MAPK	41,2	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_2044	Kinase, CMGC RCK	44,9	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_3414	Kinase, NAK	70,7	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_2362	Kinase, NEK	32,9	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas		X
GL50581_183	Kinase, NEK	78,9	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_4527	Kinase, NEK	71,3	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_3032	Kinase, NEK	85,7	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_1533	Kinase, NEK	90,2	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_785	Kinase, NEK	124,8	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_4210	Kinase, NEK	54,3	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_1017	Kinase, NEK	57,3	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_1820	Kinase, NEK	155	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_365	Kinase, NEK	43	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_868	Kinase, NEK	64,6	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_809	Kinase, NEK	98,6	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_4105	Kinase, NEK	32,6	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_3756	Kinase, NEK	53	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_449	Kinase, NEK	42,4	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_3117	Kinase, NEK	33,4	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_4360	Kinase, NEK	65,3	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_2054	Kinase, NEK	67	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_4125	Kinase, NEK	67,3	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_1889	Kinase, NEK	113,3	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_4533	Kinase, NEK	70,2	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_1456	Kinase, NEK	34	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_75	Kinase, NEK	100,2	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_1925	Kinase, NEK	124,5	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_3673	Kinase, NEK	58,5	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_3733	Kinase, NEK	133,8	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_1648	Kinase, NEK	34,7	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_516	Kinase, NEK	38,4	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_4117	Kinase, NEK	48,5	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_3101	Kinase, NEK	76	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_2633	Kinase, NEK	123,4	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_402	Kinase, NEK	86,1	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_813	Kinase, NEK	136,1	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_3201	Kinase, NEK	68,5	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_2264	Kinase, NEK	61,1	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50581_2915	Kinase, NEK	107,9	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	

GL50581_3516	Kinase, NEK	41,6	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50581_137	Kinase, NEK	34,8	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50581_1304	Kinase, NEK	69,4	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50581_4037	Kinase, NEK	31,7	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50581_2665	Kinase, NEK	33,5	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50581_3360	Kinase, NEK	35,8	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50581_3803	Kinase, NEK	136,8	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50581_1140	Kinase, NEK	54,2	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50581_3755	Kinase, NEK	31,6	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50581_1588	Kinase, PLK	77,1	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_797	Kinase, SCY1	103	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_1971	Kinase, STE STE20	39,6	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_4098	Kinase, STE STE20	58,1	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_917	Kinase, STE STE20	46,8	0	Presente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_2522	Kinase, STE STE20	64,1	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50581_199	Kinase, ULK	211,9	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas		X
GL50581_106	Kinase, VPS15	233,5	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas		X
GL50581_4050	Kinesin-13	79,6	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_1468	Kinesin-16	88	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_4441	Kinesin-2	80,3	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_2346	Kinesin-2	71,8	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_581	Kinesin-3	120,8	0	Ausente	Transporte	O	X
GL50581_583	Kinesin-3	120,8	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_1923	Kinesin-9	83,7	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_2390	Kinesin-associated protein	86,3	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_3104	La ribonucleoprotein, putative	39,1	0	Ausente	Unión	X	
GL50581_1474	L-asparaginase	44,1	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_2426	Leucine-rich repeat protein	62,9	0	Presente	Otras	X	
GL50581_4262	Leucine-rich repeat protein	87,9	1	Presente	Otras	X	
GL50581_1373	Leucine-rich repeat protein	86,7	1	Presente	Otras	X	
GL50581_821	Leucine-rich repeat protein 1 virus receptor protein	85,2	0	Presente	Otras	X	X
GL50581_4338	Lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein	469,4	0	Ausente	Otras		X
GL50581_445	Liver stage antigen-like protein	198,3	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_3754	Long chain fatty acid CoA ligase 4	90	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_3493	Long chain fatty acid CoA ligase 5	169,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas		X
GL50581_2579	Long chain fatty acid CoA ligase 5	94,8	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	
GL50581_2104	Long chain fatty acid CoA ligase 5	82,5	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	
GL50581_1322	Low molecular weight protein-tyrosine-phosphatase	17,5	0	Presente	Otras		X
GL50581_2009	L-serine dehydratase	57	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_4130	L-serine dehydratase	56,2	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_2711	Lysyl-tRNA synthetase	66,3	0	Ausente	Traducción	X	

GL50581_1500	Macrophage migration inhibitory factor	12,5	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_3442	Malate dehydrogenase	35,6	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_4231	Malic enzyme	61,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_4366	Manganese-dependent inorganic pyrophosphatase,	73,5	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50581_4213	MCT-1 protein-like protein	21,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_3577	MDR protein-like protein	59,2	14	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_686	Median body protein	100,4	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50581_4302	Metal-dependent hydrolase related to alanyl-tRNA synthetase	42,7	0	Ausente	Unión	X	
GL50581_432	Metallo-beta-lactamase superfamily protein	34,7	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_3036	Metalloprotease, insulinase family	128,6	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50581_1564	Methionine aminopeptidase	47,9	1	Presente	Proteólisis	X	X
GL50581_2851	Methionyl-tRNA synthetase	66,8	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_1739	Methionyl-tRNA synthetase	24,7	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_875	Microsomal signal peptidase 18 kDa subunit	24,4	1	Presente	Señalización	X	
GL50581_1926	Mitotic spindle checkpoint protein MAD2	22,5	0	Ausente	Otras	X	
GL50581_4113	Mob1-like protein	24,5	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_2926	Molybdenum cofactor sulfurase	68,9	1	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_1784	Molybdopterin biosynthesis MoeB protein	30,4	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50581_3254	MRP-like ABC transporter	174,1	9	Ausente	Transporte		X
GL50581_423	Mu adaptin	48,4	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_1198	MutT/nudix family protein	27,1	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_720	MYG1 protein	40,8	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_2696	NADH oxidase	47,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_2357	NADH oxidase lateral transfer candidate	50,4	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_2480	NADPH oxidoreductase, putative	18,5	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_4496	NADP-specific glutamate dehydrogenase	49,6	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_1534	NEK-like kinase protein	58,5	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_31	Neurogenic locus Notch protein precursor	63,2	0	Presente	Unión	X	
GL50581_1346	Nicotinate phosphoribosyltransferase	69	0	Ausente	Enzimas metabólicas		X
GL50581_2057	Nitroreductase Fd-NR2	28,5	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_2200	NSF	87,4	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_4405	Nuclear LIM interactor-interacting factor 1	46,8	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_3736	Nuclear LIM interactor-interacting factor 1	30,6	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_2157	Nucleoside diphosphate kinase	43,2	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas		X
GL50581_3508	Nucleoside diphosphate kinase	16,8	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_2006	Nucleotide-binding protein 1	34,9	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_1418	Nudix hydrolase, putative	19,8	0	Ausente	Unión	X	O
GL50581_3642	NYD-SP28 protein	52,1	0	Ausente	Otras	X	
GL50581_668	Ornithine carbamoyltransferase	36,5	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_1975	Ornithine cyclodeaminase	34,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_4505	Ornithine decarboxylase	49,8	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_2265	P115, putative	103,7	0	Ausente	Transporte	X	
GL50581_1115	PcnA	33,2	0	Ausente	Otras	X	

GL50581_2781	Peptide methionine sulfoxide reductase msrA	22,1	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_1019	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor	18	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_1186	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor	21,3	0	Presente	Otras	X	X
GL50581_730	Peroxiredoxin 1	22,5	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_2907	Peroxiredoxin 1	27,7	0	Presente	Otras	X	X
GL50581_1070	Phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain	60,8	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_2530	Phosphatase	35,4	0	Ausente	Kinasas/Fosfatases	X	X
GL50581_4005	Phosphatase	42,3	0	Ausente	Kinasas/Fosfatases	X	X
GL50581_4094	Phosphatase 1 regulatory subunit, putative	53,7	0	Ausente	Unión	X	
GL50581_1567	Phosphatase, putative	72,4	0	Ausente	Kinasas/Fosfatases	X	
GL50581_88	Phosphatidyl synthase	37,5	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_3968	Phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform	39,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_1909	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, putative	32,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_649	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, putative	61,8	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	
GL50581_4088	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, putative	58,5	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	
GL50581_2131	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	73,4	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_4003	Phosphoglycerate kinase	43,4	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_1340	Phosphoglycolate phosphatase	25,4	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_2073	Phosphoinositide-3-kinase, class 3	182,5	0	Ausente	Enzimas metabólicas		X
GL50581_380	Phospholipase B	62,8	0	Presente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_128	Phospholipase B	65,5	0	Presente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_2216	Phosphomannomutase-2	56,9	0	Ausente	Enzimas metabólicas		X
GL50581_3654	Phosphomannomutase-2	73,5	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_1451	Phosphoprotein phosphatase 2A regulatory subunit	85,2	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	
GL50581_462	Phosphorylase B kinase gamma catalytic chain	159	0	Ausente	Enzimas metabólicas		X
GL50581_1109	Phosphorylase B kinase gamma catalytic chain	85,5	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_920	Phosphotyrosyl phosphatase activator protein, putative	36,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_4551	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 2	101,6	7	Ausente	Unión	X	X
GL50581_1528	PLP dependent enzymes class III	23,9	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_4414	Polyadenylate-binding protein, putative	43,8	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_28	Potassium-transporting ATPase alpha chain 1	147,6	8	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_1853	Prefoldin subunit 2	12,3	0	Ausente	Plegamiento	X	X
GL50581_2355	Prefoldin subunit 3, putative	22	0	Ausente	Plegamiento	X	X
GL50581_2847	Preimplantation protein 3	26,7	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_3668	Prenylated synaptobrevin/VAMP, putative	23,4	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_23	Programmed cell death protein-like protein	20	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_1682	Prolyl-tRNA synthetase	60,2	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_654	Proteasome subunit beta type 1	24,5	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50581_3156	Proteasome subunit beta type 2	18,9	0	Ausente	Proteólisis		X
GL50581_1828	Proteasome subunit beta type 3	23	0	Ausente	Proteólisis		X
GL50581_60	Proteasome subunit beta type 4 precursor	23,7	0	Presente	Proteólisis	X	

GL50581_1384	Proteasome subunit beta type 5 precursor	32,2	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50581_835	Proteasome subunit beta type 9 precursor	23,9	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50581_2341	Protein 21.1	65,2	0	Ausente	Unión		X
GL50581_906	Protein 21.1	55	0	Ausente	Unión		X
GL50581_2135	Protein 21.1	141,1	0	Ausente	Unión		X
GL50581_3278	Protein 21.1	87,2	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_1032	Protein 21.1	66,3	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_479	Protein 21.1	200,9	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_1272	Protein 21.1	112,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_1341	Protein 21.1	36,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_150	Protein 21.1	102,7	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_96	Protein 21.1	77,5	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_1840	Protein 21.1	87,3	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_1033	Protein 21.1	79,1	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_1875	Protein 21.1	76	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_1841	Protein 21.1	118,4	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_1843	Protein 21.1	84,2	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_2864	Protein 21.1	71,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_1812	Protein 21.1	49,5	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_4349	Protein 21.1	32	1	Ausente	Unión	X	X
GL50581_2407	Protein 21.1	57	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_993	Protein 21.1	77,3	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_2669	Protein 21.1	134,3	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_2862	Protein 21.1	67,9	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_1573	Protein 21.1	160,9	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_1105	Protein 21.1	42	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_2137	Protein 21.1	24,5	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_1458	Protein 21.1	77,5	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_3994	Protein 21.1	30,1	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_4256	Protein 21.1	112,5	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_2108	Protein 21.1	78,5	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_2253	Protein 21.1	125,3	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_186	Protein 21.1	90,2	0	Ausente	Unión	X	
GL50581_1769	Protein 21.1	55,6	0	Ausente	Unión	X	
GL50581_536	Protein 21.1	54,9	0	Ausente	Unión	X	
GL50581_2973	Protein 21.1	40	0	Presente	Unión	X	
GL50581_2879	Protein 21.1	61,1	0	Ausente	Unión	X	
GL50581_2695	Protein 21.1	115	0	Ausente	Unión	X	
GL50581_1164	Protein 21.1	74,4	0	Ausente	Unión	X	
GL50581_1284	Protein 21.1	43,2	0	Ausente	Unión	X	
GL50581_280	Protein 21.1	65	0	Ausente	Unión	X	
GL50581_968	Protein C21orf2	28,7	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_3510	Protein disulfide isomerase PDI1	25,9	0	Presente	Otras	X	X
GL50581_862	Protein disulfide isomerase PDI2	50,5	1	Presente	Otras	X	X
GL50581_2417	Protein disulfide isomerase PDI4	39,7	0	Presente	Otras	X	X

GL50581_3386	Protein disulfide isomerase PDI5	12,6	0	Presente	Otras	X	X
GL50581_3370	Protein disulfide isomerase PDI5	12,5	0	Presente	Otras	X	
GL50581_2263	Protein F17L21.10	13,4	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_216	Protein F54C1.5	74,8	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_1938	Protein phosphatase 2A B' regulatory subunit Wdb1	93,3	0	Ausente	Señalización	X	X
GL50581_4290	Protein phosphatase 2A regulatory subunit, putative	100,9	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_2076	Protein phosphatase 2C	56,9	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_2771	Protein phosphatase methylesterase-1	40,3	0	Ausente	Otras		X
GL50581_2293	Protein phosphatase PP2A regulatory subunit A	72,4	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_630	Protein phosphatase PP2A regulatory subunit B	52,5	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_1357	Purine nucleoside phosphorylase lateral transfer candidate	86	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_1192	Pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase alpha subunit	59,6	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_2643	Pyruvate kinase	70,4	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_3239	Pyruvate kinase	60,7	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_4299	Pyruvate, phosphate dikinase	97,5	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_4147	Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase	138,8	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_1047	Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase	131,6	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_3996	Rab GDI	52,3	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_3346	Rab11	23,6	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_4330	Rab1a	23,1	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_2623	Rab2a	23,8	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_2525	Rab2b	24,6	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_1585	Rac/Rho-like protein	23,8	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_378	Radial-spoke protein	34,2	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_1808	RAN binding protein 1	18,8	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_1736	Reductase, putative	33,1	0	Presente	Otras	X	
GL50581_4476	Regulator of nonsense transcripts 1-like protein	147,8	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_181	RER1-like protein-retention of ER protein	21,2	3	Ausente	Transporte	X	
GL50581_1429	Rho GAP, putative	21,7	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_4335	Ribokinase	36,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_4078	Ribose 5-phosphate isomerase	15,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_708	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	40,6	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_1319	Ribosomal protein L10	24,2	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_4227	Ribosomal protein L10a	24,9	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_3003	Ribosomal protein L11	19,8	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_3184	Ribosomal protein L12	19,6	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_3373	Ribosomal protein L13	26,5	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_1758	Ribosomal protein L13a	22,8	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_1242	Ribosomal protein L14	14,8	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_979	Ribosomal protein L15	24,3	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_2441	Ribosomal protein L17	18,7	0	Ausente	Ribosomales	X	
GL50581_332	Ribosomal protein L18	20,1	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_1687	Ribosomal protein L18a	20,6	0	Ausente	Ribosomales	X	X

GL50581_2587	Ribosomal protein L19	22,9	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_1614	Ribosomal protein L2	26,9	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_4091	Ribosomal protein L21	18,3	0	Ausente	Ribosomales	X	
GL50581_3626	Ribosomal protein L23	15,4	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_1471	Ribosomal protein L23A	16	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_3467	Ribosomal protein L24A	11,9	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_1519	Ribosomal protein L26	15,5	0	Ausente	Ribosomales	X	
GL50581_2902	Ribosomal protein L27	15,2	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_1972	Ribosomal protein L27a	17	0	Ausente	Ribosomales	X	
GL50581_348	Ribosomal protein L3	42,8	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_3451	Ribosomal protein L30	11,6	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_1473	Ribosomal protein L31B	12,1	0	Ausente	Ribosomales	X	
GL50581_3463	Ribosomal protein L35	14,3	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_4410	Ribosomal protein L35a	13,9	0	Ausente	Ribosomales	X	
GL50581_561	Ribosomal protein L37a	10,5	0	Ausente	Ribosomales	X	
GL50581_4247	Ribosomal protein L4	35	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_1856	Ribosomal protein L5	33,9	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_351	Ribosomal protein L7	27,1	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_195	Ribosomal protein L7a	25,3	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_1269	Ribosomal protein L9	20,8	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_4436	Ribosomal protein P1B	11,9	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_357	Ribosomal protein S10B	15,6	0	Ausente	Ribosomales	X	
GL50581_3429	Ribosomal protein S11	23,2	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_3119	Ribosomal protein S12	13,7	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_4214	Ribosomal protein S13	17,6	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_1464	Ribosomal protein S14	15,7	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_319	Ribosomal protein S15	16,7	0	Ausente	Ribosomales	X	
GL50581_1826	Ribosomal protein S15A	14,8	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_4444	Ribosomal protein S16	17,6	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_3462	Ribosomal protein S17	15,8	0	Ausente	Ribosomales	X	
GL50581_1214	Ribosomal protein S18	17,5	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_2562	Ribosomal protein S2	26,7	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_1240	Ribosomal protein S20	13,9	0	Ausente	Ribosomales	X	
GL50581_3249	Ribosomal protein S21	9,7	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_3076	Ribosomal protein S23	15,9	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_2403	Ribosomal protein S24	14,8	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_2766	Ribosomal protein S26	12,8	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_2292	Ribosomal protein S27	14,9	0	Ausente	Ribosomales	X	
GL50581_977	Ribosomal protein S3	24,7	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_1388	Ribosomal protein S3a	28	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_4503	Ribosomal protein S4	30,4	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_3915	Ribosomal protein S5	21,1	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_3377	Ribosomal protein S6	27,9	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_1600	Ribosomal protein S7	21,8	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_260	Ribosomal protein S8	19,3	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_306	Ribosomal protein S9	21,6	0	Ausente	Ribosomales	X	X

GL50581_3216	Ribosomal protein SA	27,9	0	Ausente	Ribosomales	X	X
GL50581_4061	Ribulose-phosphate 3-epimerase	25,8	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_4271	RNA binding protein, putative	31,5	0	Ausente	Unión	X	
GL50581_843	RNA helicase, putative	79	0	Ausente	Otras	X	
GL50581_1717	RNase L inhibitor	74,9	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_582	RTCB PROTEIN	64,1	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_1154	SALP-1	29,9	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_4403	Sec1 vATPase	71,6	0	Ausente	Transporte	X	
GL50581_3176	Sec1, putative	64,5	0	Ausente	Transporte	X	
GL50581_1683	Sec61-alpha	51,8	9	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_2529	Ser/Thr phosphatase	35,5	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_1324	Ser/Thr phosphatase 2A, 65kDa reg sub A	71,8	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_4150	Ser/Thr phosphatase 2C, putative	38,8	0	Presente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_2811	Ser/Thr phosphatase PP2A-2 catalytic subunit	35,4	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_184	Ser/Thr protein kinase	28,2	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_1948	Ser/Thr protein phosphatase PP1-alpha 2 catalytic subunit	37,1	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_3181	Serine peptidase, putative	53,3	0	Presente	Proteólisis	X	
GL50581_627	Serine/Threonine Kinase	60,2	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	
GL50581_1099	Serine/Threonine protein phosphatase	36,4	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_2177	Serine/threonine protein phosphatase 4	35,1	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_1252	Serine/threonine protein phosphatase 5	57,3	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_513	Serine/threonine protein phosphatase 5	42,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_2483	Serine/threonine protein phosphatase 7	47,3	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_1697	Serine/threonine protein phosphatase PP-X isozyme 2	38,2	0	Ausente	Kinasas/Fosfatasas	X	X
GL50581_3924	Serine-pyruvate aminotransferase	41,4	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	
GL50581_4443	Serpin 1	39	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_4129	Seryl-tRNA synthetase	51,6	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_1984	Seven transmembrane protein 1	32,8	7	Presente	Otras	X	X
GL50581_2789	Sigma adaptin	16,8	0	Ausente	Transporte	X	
GL50581_424	Signal recognition particle	68,2	0	Ausente	Señalización	X	
GL50581_1934	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein	31,7	0	Presente	Unión	X	X
GL50581_3891	Socius	54,7	0	Ausente	Otras	X	
GL50581_1145	Sperm-associated WD-repeat protein	78,6	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_2356	Spindle pole protein, putative	109,9	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_1270	Spindle pole protein, putative	62	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_439	Spindle pole protein, putative	103,8	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_1455	Spindle pole protein, putative	72,5	0	Ausente	Otras	X	
GL50581_2809	Spindle pole protein, putative	65,8	0	Ausente	Otras	X	
GL50581_1423	Spindle pole protein, putative	58,9	0	Ausente	Otras	X	
GL50581_1219	Spindle pole protein, putative	40,4	0	Ausente	Otras	X	
GL50581_3190	Spindle pole protein, putative	60,1	0	Ausente	Otras	X	
GL50581_1901	Spindle pole protein, putative	55,3	0	Ausente	Otras	X	
GL50581_3952	SRP GTPase	58,5	0	Ausente	Señalización	X	
GL50581_2028	Stress-induced-phosphoprotein 1	65,7	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_1274	STU2-like protein	187,1	0	Ausente	Unión	X	X

GL50581_1006	Synaptobrevin-like protein	26,3	2	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_4059	Syntaxin 1A	27,9	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_3666	Syntaxin-like protein 1	32,6	1	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_1775	TBP-interacting protein TIP49	52,9	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_834	TBP-interacting protein TIP49	51,5	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_1189	TCP-1 chaperonin subunit alpha	59,1	0	Ausente	Plegamiento	X	X
GL50581_4492	TCP-1 chaperonin subunit alpha	56,3	0	Ausente	Plegamiento	X	
GL50581_1213	TCP-1 chaperonin subunit epsilon	61	0	Ausente	Plegamiento	X	X
GL50581_2250	TCP-1 chaperonin subunit eta	64,8	0	Ausente	Plegamiento	X	X
GL50581_4177	TCP-1 chaperonin subunit gamma	61,9	0	Ausente	Plegamiento	X	X
GL50581_107	TCP-1 chaperonin subunit theta	60,2	0	Ausente	Plegamiento	X	X
GL50581_3856	TCP-1 chaperonin subunit zeta	61,2	0	Ausente	Plegamiento	X	X
GL50581_1524	Tem-1-like protein	22,5	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_4057	Tenascin precursor	27,8	0	Presente	Otras	X	X
GL50581_1982	Tenascin-like protein	61,2	0	Presente	Otras	X	X
GL50581_1227	Tenascin-like protein	64,7	0	Presente	Otras	X	X
GL50581_832	Thioredoxin reductase	33,9	1	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_1511	Threonine dehydratase lateral transfer candidate	104,1	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	
GL50581_2472	Threonyl-tRNA synthetase	79	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_2704	Thymus-specific serine protease precursor	58,2	0	Presente	Proteólisis	X	
GL50581_2661	TMP52	52,1	1	Presente	Otras	X	X
GL50581_2911	TMP55	55,2	1	Presente	Otras	X	
GL50581_3137	Topoisomerase II	46,5	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_4197	Transglutaminase/protease, putative	52,5	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50581_2014	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	47,5	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_770	Transketolase	77,4	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_1199	Traducción elongation factor	25	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50581_2378	Traducción elongation factor	19,9	0	Ausente	Traducción	X	
GL50581_2918	Traducción initiation factor	12,1	0	Ausente	Traducción	X	
GL50581_978	Traducción initiation factor 6	26,7	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50581_3943	Traducción initiation factor eIF-4A, putative	43,3	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50581_2909	Traducción initiation factor IF-2, putative	103,5	0	Ausente	Traducción	X	
GL50581_4017	Traducción initiation inhibitor	12,9	0	Ausente	Traducción	X	X
GL50581_1369	Triosephosphate isomerase, cytosolic	27,8	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_4383	TRP domain containing protein	198,9	0	Ausente	Unión		X
GL50581_2075	Tryptophanyl-tRNA synthetase	48,1	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_817	Tubby superfamily protein	167,4	0	Ausente	Proteólisis		X
GL50581_2898	Tubulin tyrosine ligase	73,6	0	Ausente	Citoesqueleto	X	X
GL50581_3898	Type II inositol-1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase precursor	80,4	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_22	UBC3	22	0	Ausente	Proteólisis	X	
GL50581_1138	Ubiquitin	8,7	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50581_450	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14	91,6	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50581_2251	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 4	92,5	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50581_4433	Ubiquitin fusion degradation protein 1	35,2	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50581_1107	Ubiquitin protein, putative	56,1	0	Ausente	Proteólisis	X	

GL50581_321	Ubiquitin-conjugating enzyme E1	120,9	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50581_2687	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa	17,7	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50581_1386	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa	21,6	0	Ausente	Proteólisis	X	
GL50581_919	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa 3	16,9	0	Ausente	Proteólisis	X	X
GL50581_1523	UPL-1	34,4	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_1116	Uracil phosphoribosyltransferase	23,3	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_1634	Uridine kinase	65,8	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	
GL50581_1133	Uridine kinase	76,5	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	
GL50581_1453	UsoAp	49,6	0	Ausente	transporte	X	
GL50581_2296	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	49,4	0	Ausente	Enzimas metabólicas	X	X
GL50581_3761	Vacuolar ATP synthase 16 kDa proteolipid subunit	17,5	4	Ausente	Vacuolar	X	
GL50581_2192	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A	71,5	0	Ausente	Vacuolar	X	X
GL50581_3409	Vacuolar ATP synthase subunit B	54,5	0	Ausente	Vacuolar	X	X
GL50581_2882	Vacuolar ATP synthase subunit C	56,2	0	Ausente	Vacuolar	X	X
GL50581_808	Vacuolar ATP synthase subunit d	39,6	0	Ausente	Vacuolar	X	
GL50581_3845	Vacuolar ATP synthase subunit D	29,6	0	Ausente	Vacuolar	X	
GL50581_2610	Vacuolar ATP synthase subunit H	59,4	0	Ausente	Vacuolar	X	X
GL50581_2924	Vacuolar protein sorting 11	121	0	Ausente	Transporte	X	
GL50581_1617	Vacuolar protein sorting 26, putative	58,8	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_1810	Vacuolar protein sorting 29	50,8	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_4348	Vacuolar protein sorting 35	87,6	0	Ausente	Transporte	X	X
GL50581_841	Vacuolar proton-ATPase subunit, putative	104,2	6	Ausente	Vacuolar	X	X
GL50581_3783	V-SNARE	22,9	1	Ausente	Transporte	X	
GL50581_1	VSP	41,5	1	Presente	Otras	X	X
GL50581_197	VSP	12,9	1	Ausente	Otras	X	X
GL50581_3401	VSP	38,3	0	Presente	Otras	X	X
GL50581_1791	VSP	64,1	1	Ausente	Otras	X	X
GL50581_2786	VSP	18,4	1	Ausente	Otras	X	
GL50581_2604	VSP	41,5	1	Ausente	Otras	X	
GL50581_1666	WD-40 repeat protein	59,7	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_3937	WD-40 repeat protein family	38,4	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_3993	WD-repeat membrane protein	213,5	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_1320	Wos2 protein	20,8	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_4460	Xaa-Pro dipeptidase	49,8	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_4517	Yip1 protein	27	5	Ausente	transporte		X
GL50581_898	Zinc finger domain-containing protein	44,8	0	Ausente	Unión	X	X
GL50581_4205	ZipA	92,3	0	Ausente	Otras	X	X
GL50581_2647	ZipA	66,6	0	Ausente	Otras	X	
GL50581_3892	ZPR1	52,1	0	Ausente	Unión	X	X

# Bibliografía

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Abodeely, M., DuBois, K.N., Hehl, A., Stefanic, S., Sajid, M., DeSouza, W., Attias, M., Engel, J.C., Hsieh, I., Fetter, R.D., *et al.* (2009). A contiguous compartment functions as endoplasmic reticulum and endosome/lysosome in *Giardia lamblia*. *Eukaryotic cell* 8, 1665-1676.
- Adam, R.D. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical microbiology reviews* 14, 447-475.
- Aline, F., Bout, D., Amigorena, S., Roingeard, P., and Dimier-Poisson, I. (2004). *Toxoplasma gondii* antigen-pulsed-dendritic cell-derived exosomes induce a protective immune response against *T. gondii* infection. *Infection and immunity* 72, 4127-4137.
- Allen, C.L., Liao, D., Chung, W.L., and Field, M.C. (2007). Dileucine signal-dependent and AP-1-independent targeting of a lysosomal glycoprotein in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology* 156, 175-190.
- Andreu, Z., and Yanez-Mo, M. (2014). Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Frontiers in immunology* 5, 442.
- Ankarklev, J., Jerlstrom-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K., and Svard, S.G. (2010). Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat Rev Microbiol* 8, 413-422.
- Aspberg, A., Binkert, C., and Ruoslahti, E. (1995). The versican C-type lectin domain recognizes the adhesion protein tenascin-R. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 10590-10594.
- Aspberg, A., Miura, R., Bourdoulous, S., Shimonaka, M., Heinegard, D., Schachner, M., Ruoslahti, E., and Yamaguchi, Y. (1997). The C-type lectin domains of lecticans, a family of aggregating chondroitin sulfate proteoglycans, bind tenascin-R by protein-protein interactions independent of carbohydrate moiety. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 10116-10121.
- Atayde, V.D., Hassani, K., da Silva Lira Filho, A., Borges, A.R., Adhikari, A., Martel, C., and Olivier, M. (2016). *Leishmania* exosomes and other virulence factors: Impact on innate immune response and macrophage functions. *Cellular immunology* 309, 7-18.
- Azmi, I., Davies, B., Dimaano, C., Payne, J., Eckert, D., Babst, M., and Katzmann, D.J. (2006). Recycling of ESCRTs by the AAA-ATPase Vps4 is regulated by a conserved VSL region in Vta1. *The Journal of cell biology* 172, 705-717.
- Babst, M. (2011). Endosomal sorting complex required for transport (ESCRT). *Editorial. Traffic* 12, 1281.
- Babst, M., Davies, B.A., and Katzmann, D.J. (2011). Regulation of Vps4 during MVB sorting and cytokinesis. *Traffic* 12, 1298-1305.
- Babst, M., Sato, T.K., Banta, L.M., and Emr, S.D. (1997). Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p. *The EMBO journal* 16, 1820-1831.
- Babst, M., Wendland, B., Estepa, E.J., and Emr, S.D. (1998). The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *The EMBO journal* 17, 2982-2993.
- Baietti, M.F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., *et al.* (2012). Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nature cell biology* 14, 677-685.
- Balzar, M., Briaire-de Bruijn, I.H., Rees-Bakker, H.A., Prins, F.A., Helfrich, W., de Leij, L., Riethmuller, G., Alberti, S., Warnaar, S.O., Fleuren, G.J., *et al.* (2001). Epidermal growth factor-like repeats mediate lateral and reciprocal interactions of Ep-CAM molecules in homophilic adhesions. *Molecular and cellular biology* 21, 2570-2580.
- Baron, M. (2003). An overview of the Notch signalling pathway. *Seminars in cell & developmental biology* 14, 113-119.

- Basualdo, J.A., Cordoba, M.A., de Luca, M.M., Ciarmela, M.L., Pezzani, B.C., Grenovero, M.S., and Minvielle, M.C. (2007). Intestinal parasitoses and environmental factors in a rural population of Argentina, 2002-2003. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 49, 251-255.
- Beckett, K., Monier, S., Palmer, L., Alexandre, C., Green, H., Bonneil, E., Raposo, G., Thibault, P., Le Borgne, R., and Vincent, J.P. (2013). Drosophila S2 cells secrete wingless on exosome-like vesicles but the wingless gradient forms independently of exosomes. *Traffic* 14, 82-96.
- Bendich, A., and Chergaff, E. (1946). Isolation and characterization of two antigenic fractions of proteus OX-19. *Federation proceedings* 5, 121.
- Benere, E., Van Assche, T., Van Ginneken, C., Peulen, O., Cos, P., and Maes, L. (2012). Intestinal growth and pathology of Giardia duodenalis assemblage subtype A(I), A(II), B and E in the gerbil model. *Parasitology* 139, 424-433.
- Berrondo, C., Flax, J., Kucherov, V., Siebert, A., Osinski, T., Rosenberg, A., Fucile, C., Richeimer, S., and Beckham, C.J. (2016). Expression of the Long Non-Coding RNA HOTAIR Correlates with Disease Progression in Bladder Cancer and Is Contained in Bladder Cancer Patient Urinary Exosomes. *PLoS one* 11, e0147236.
- Bervers, E.M., Comfurius, P., Dekkers, D.W., and Zwaal, R.F. (1999). Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochimica et biophysica acta* 1439, 317-330.
- Bishop, N., and Woodman, P. (2001). TSG101/mammalian VPS23 and mammalian VPS28 interact directly and are recruited to VPS4-induced endosomes. *The Journal of biological chemistry* 276, 11735-11742.
- Bobrie, A., Krumeich, S., Rey, F., Recchi, C., Moita, L.F., Seabra, M.C., Ostrowski, M., and Thery, C. (2012). Rab27a supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression. *Cancer research* 72, 4920-4930.
- Bockman, D.E., and Winborn, W.B. (1968). Electron microscopic localization of exogenous ferritin within vacuoles of Giardia muris. *J Protozool* 15, 26-30.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.
- Byrd, L.G., Conrad, J.T., and Nash, T.E. (1994). Giardia lamblia infections in adult mice. *Infection and immunity* 62, 3583-3585.
- Caccio, S.M., Lalle, M., and Svard, S.G. (2018). Host specificity in the Giardia duodenalis species complex. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 66, 335-345.
- Cai, H., Yu, S., Menon, S., Cai, Y., Lazarova, D., Fu, C., Reinisch, K., Hay, J.C., and Ferro-Novick, S. (2007). TRAPPI tethers COPII vesicles by binding the coat subunit Sec23. *Nature* 445, 941-944.
- Castillo-Romero, A., Leon-Avila, G., Wang, C.C., Perez Rangel, A., Camacho Nuez, M., Garcia Tovar, C., Ayala-Summano, J.T., Luna-Arias, J.P., and Hernandez, J.M. (2010). Rab11 and actin cytoskeleton participate in Giardia lamblia encystation, guiding the specific vesicles to the cyst wall. *PLoS neglected tropical diseases* 4, e697.
- Clarke, C.J., Snook, C.F., Tani, M., Matmati, N., Marchesini, N., and Hannun, Y.A. (2006). The extended family of neutral sphingomyelinases. *Biochemistry* 45, 11247-11256.
- Clarke, C.J., Truong, T.G., and Hannun, Y.A. (2007). Role for neutral sphingomyelinase-2 in tumor necrosis factor alpha-stimulated expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM) in lung epithelial cells: p38 MAPK is an upstream regulator of nSMase2. *The Journal of biological chemistry* 282, 1384-1396.

- Clayton, A., Turkes, A., Dewitt, S., Steadman, R., Mason, M.D., and Hallett, M.B. (2004). Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18, 977-979.
- Colombo, M., Giannandrea, D., Lesma, E., Basile, A., and Chiaramonte, R. (2019). Extracellular Vesicles Enhance Multiple Myeloma Metastatic Dissemination. *International journal of molecular sciences* 20.
- Colombo, M., Moita, C., van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Manel, N., Moita, L.F., Thery, C., and Raposo, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of cell science* 126, 5553-5565.
- Colombo, M., Raposo, G., and Thery, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual review of cell and developmental biology* 30, 255-289.
- Cucco, F., Palumbo, E., Camerini, S., D'Alessio, B., Quarantotti, V., Casella, M.L., Rizzo, I.M., Cukrov, D., Delia, D., Russo, A., et al. (2018). Separase prevents genomic instability by controlling replication fork speed. *Nucleic Acids Res* 46, 267-278.
- Chargaff, E., and West, R. (1946). The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *The Journal of biological chemistry* 166, 189-197.
- Chen, W., Feng, Y., Chen, D., and Wandinger-Ness, A. (1998). Rab11 is required for trans-golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor. *Molecular biology of the cell* 9, 3241-3257.
- Chiquet-Ehrismann, R., and Chiquet, M. (2003). Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *The Journal of pathology* 200, 488-499.
- Dalton, A.J. (1975). Microvesicles and vesicles of multivesicular bodies versus "virus-like" particles. *Journal of the National Cancer Institute* 54, 1137-1148.
- de Gassart, A., Geminard, C., Fevrier, B., Raposo, G., and Vidal, M. (2003). Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* 102, 4336-4344.
- Diamond, L.S., Harlow, D.R., and Cunnick, C.C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 72, 431-432.
- Eckmann, L. (2003). Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite immunology* 25, 259-270.
- Edgar, J.R., Eden, E.R., and Futter, C.E. (2014). Hrs- and CD63-dependent competing mechanisms make different sized endosomal intraluminal vesicles. *Traffic* 15, 197-211.
- Efstratiou, A., Ongerth, J.E., and Karanis, P. (2017). Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011-2016. *Water research* 114, 14-22.
- Elias, E.V., Quiroga, R., Gottig, N., Nakanishi, H., Nash, T.E., Neiman, A., and Lujan, H.D. (2008). Characterization of SNAREs determines the absence of a typical Golgi apparatus in the ancient eukaryote *Giardia lamblia*. *The Journal of biological chemistry* 283, 35996-36010.
- Emery, S.J., Mirzaei, M., Vuong, D., Pascovici, D., Chick, J.M., Lacey, E., and Haynes, P.A. (2016). Induction of virulence factors in *Giardia duodenalis* independent of host attachment. *Scientific reports* 6, 20765.
- Escola, J.M., Kleijmeer, M.J., Stoorvogel, W., Griffith, J.M., Yoshie, O., and Geuze, H.J. (1998). Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *The Journal of biological chemistry* 273, 20121-20127.
- Evans-Osses, I., Mojoli, A., Monguio-Tortajada, M., Marcilla, A., Aran, V., Amorim, M., Inal, J., Borrás, F.E., and Ramirez, M.I. (2017). Microvesicles released from *Giardia intestinalis* disturb host-pathogen response in vitro. *European journal of cell biology* 96, 131-142.

- Farthing, M.J., Mata, L., Urrutia, J.J., and Kronmal, R.A. (1986). Natural history of Giardia infection of infants and children in rural Guatemala and its impact on physical growth. *The American journal of clinical nutrition* 43, 395-405.
- Faso, C., and Hehl, A.B. (2011). Membrane trafficking and organelle biogenesis in Giardia lamblia: use it or lose it. *International journal for parasitology* 41, 471-480.
- Faure, J., Lachenal, G., Court, M., Hirrlinger, J., Chatellard-Causse, C., Blot, B., Grange, J., Schoehn, G., Goldberg, Y., Boyer, V., et al. (2006). Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Molecular and cellular neurosciences* 31, 642-648.
- Feely, D.E., and Dyer, J.K. (1987). Localization of acid phosphatase activity in Giardia lamblia and Giardia muris trophozoites. *The Journal of protozoology* 34, 80-83.
- Feliziani, C., Zamponi, N., Gottig, N., Ropolo, A.S., Lanfredi-Rangel, A., and Touz, M.C. (2015). The giardial ENTH protein participates in lysosomal protein trafficking and endocytosis. *Biochimica et biophysica acta* 1853, 646-659.
- Feng, Y., and Xiao, L. (2011). Zoonotic potential and molecular epidemiology of Giardia species and giardiasis. *Clinical microbiology reviews* 24, 110-140.
- Field, M.C., and Dacks, J.B. (2009). First and last ancestors: reconstructing evolution of the endomembrane system with ESCRTs, vesicle coat proteins, and nuclear pore complexes. *Curr Opin Cell Biol* 21, 4-13.
- Franzen, O., Jerlstrom-Hultqvist, J., Castro, E., Sherwood, E., Ankarklev, J., Reiner, D.S., Palm, D., Andersson, J.O., Andersson, B., and Svard, S.G. (2009). Draft genome sequencing of giardia intestinalis assemblage B isolate GS: is human giardiasis caused by two different species? *PLoS pathogens* 5, e1000560.
- Fraser, D., Bilenko, N., Deckelbaum, R.J., Dagan, R., El-On, J., and Naggan, L. (2000). Giardia lamblia carriage in Israeli Bedouin infants: risk factors and consequences. *Clin Infect Dis* 30, 419-424.
- Fraser, D., Dagan, R., Naggan, L., Greene, V., El-On, J., Abu-Rbiah, Y., and Deckelbaum, R.J. (1997). Natural history of Giardia lamblia and Cryptosporidium infections in a cohort of Israeli Bedouin infants: a study of a population in transition. *Am J Trop Med Hyg* 57, 544-549.
- Friend, D.S. (1966). The fine structure of Giardia muris. *The Journal of cell biology* 29, 317-332.
- Frontera, L.S., Moyano, S., Quassollo, G., Lanfredi-Rangel, A., Ropolo, A.S., and Touz, M.C. (2018). Lactoferrin and lactoferricin endocytosis halt Giardia cell growth and prevent infective cyst production. *Scientific reports* 8, 18020.
- Fujita, H., Yamanaka, M., Imamura, K., Tanaka, Y., Nara, A., Yoshimori, T., Yokota, S., and Himeno, M. (2003). A dominant negative form of the AAA ATPase SKD1/VPS4 impairs membrane trafficking out of endosomal/lysosomal compartments: class E vps phenotype in mammalian cells. *Journal of cell science* 116, 401-414.
- Geiger, A., Hirtz, C., Becue, T., Bellard, E., Centeno, D., Gargani, D., Rossignol, M., Cuny, G., and Peltier, J.B. (2010). Exocytosis and protein secretion in Trypanosoma. *BMC microbiology* 10, 20.
- Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., et al. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5, R80.
- Ghannoum, M.A. (2000). Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical microbiology reviews* 13, 122-143, table of contents.
- Gillin, F.D., Hagblom, P., Harwood, J., Aley, S.B., Reiner, D.S., McCaffery, M., So, M., and Guiney, D.G. (1990). Isolation and expression of the gene for a major surface protein of Giardia lamblia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4463-4467.

- Gomez-Arreaza, A., Acosta, H., Quinones, W., Concepcion, J.L., Michels, P.A., and Avilan, L. (2014). Extracellular functions of glycolytic enzymes of parasites: unpredicted use of ancient proteins. *Molecular and biochemical parasitology* 193, 75-81.
- Grebaut, P., Chuchana, P., Brizard, J.P., Demetree, E., Seveno, M., Bossard, G., Jouin, P., Vincendeau, P., Bengaly, Z., Boulange, A., *et al.* (2009). Identification of total and differentially expressed excreted-secreted proteins from *Trypanosoma congolense* strains exhibiting different virulence and pathogenicity. *International journal for parasitology* 39, 1137-1150.
- Gruenberg, J., and Stenmark, H. (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nature reviews Molecular cell biology* 5, 317-323.
- Hardin, W.R., Li, R., Xu, J., Shelton, A.M., Alas, G.C.M., Minin, V.N., and Paredes, A.R. (2017). Myosin-independent cytokinesis in *Giardia* utilizes flagella to coordinate force generation and direct membrane trafficking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, E5854-E5863.
- Herman, E.K., Walker, G., van der Giezen, M., and Dacks, J.B. (2011). Multivesicular bodies in the enigmatic amoeboflagellate *Breviata anathema* and the evolution of ESCRT 0. *Journal of cell science* 124, 613-621.
- Hessvik, N.P., and Llorente, A. (2018). Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 75, 193-208.
- Hoshino, D., Kirkbride, K.C., Costello, K., Clark, E.S., Sinha, S., Grega-Larson, N., Tyska, M.J., and Weaver, A.M. (2013). Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior. *Cell reports* 5, 1159-1168.
- Hsu, C., Morohashi, Y., Yoshimura, S., Manrique-Hoyos, N., Jung, S., Lauterbach, M.A., Bakhti, M., Gronborg, M., Mobius, W., Rhee, J., *et al.* (2010). Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *The Journal of cell biology* 189, 223-232.
- Hu, G., Gong, A.Y., Roth, A.L., Huang, B.Q., Ward, H.D., Zhu, G., Larusso, N.F., Hanson, N.D., and Chen, X.M. (2013). Release of luminal exosomes contributes to TLR4-mediated epithelial antimicrobial defense. *PLoS pathogens* 9, e1003261.
- Huang, D.B., and White, A.C. (2006). An updated review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Gastroenterol Clin North Am* 35, 291-314, viii.
- Hugel, B., Martinez, M.C., Kunzelmann, C., and Freyssinet, J.M. (2005). Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology* 20, 22-27.
- Huotari, J., and Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *EMBO J* 30, 3481-3500.
- Hurley, J.H. (2015). ESCRTs are everywhere. *The EMBO journal* 34, 2398-2407.
- Hurley, J.H., Boura, E., Carlson, L.A., and Rozycki, B. (2010). Membrane budding. *Cell* 143, 875-887.
- Hurley, J.H., and Hanson, P.I. (2010). Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 556-566.
- Hyenne, V., Apaydin, A., Rodriguez, D., Spiegelhalter, C., Hoff-Yoessle, S., Diem, M., Tak, S., Lefebvre, O., Schwab, Y., Goetz, J.G., *et al.* (2015). RAL-1 controls multivesicular body biogenesis and exosome secretion. *The Journal of cell biology* 211, 27-37.
- Ikonen, E. (2001). Roles of lipid rafts in membrane transport. *Current opinion in cell biology* 13, 470-477.
- Jackson, C.E., Scruggs, B.S., Schaffer, J.E., and Hanson, P.I. (2017). Effects of Inhibiting VPS4 Support a General Role for ESCRTs in Extracellular Vesicle Biogenesis. *Biophysical journal* 113, 1342-1352.

- Jaiswal, R., and Sedger, L.M. (2019). Intercellular Vesicular Transfer by Exosomes, Microparticles and Oncosomes - Implications for Cancer Biology and Treatments. *Frontiers in oncology* 9, 125.
- Janas, T., Janas, M.M., Sapon, K., and Janas, T. (2015). Mechanisms of RNA loading into exosomes. *FEBS letters* 589, 1391-1398.
- Jerlstrom-Hultqvist, J., Franzen, O., Ankarklev, J., Xu, F., Nohynkova, E., Andersson, J.O., Svard, S.G., and Andersson, B. (2010). Genome analysis and comparative genomics of a *Giardia intestinalis* assemblage E isolate. *BMC genomics* 11, 543.
- Johnstone, R.M., Adam, M., Hammond, J.R., Orr, L., and Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *The Journal of biological chemistry* 262, 9412-9420.
- Kalra, H., Drummen, G.P., and Mathivanan, S. (2016). Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *International journal of molecular sciences* 17, 170.
- Kalra, H., Simpson, R.J., Ji, H., Aikawa, E., Altevogt, P., Askenase, P., Bond, V.C., Borrás, F.E., Breakefield, X., Budnik, V., et al. (2012). Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS biology* 10, e1001450.
- Karanis, P., and Ey, P.L. (1998). Characterization of axenic isolates of *Giardia intestinalis* established from humans and animals in Germany. *Parasitology research* 84, 442-449.
- Kattenbach, W.M., Pimenta, P.F., de Souza, W., and Pinto da Silva, P. (1991). *Giardia duodenalis*: a freeze-fracture, fracture-flip and cytochemistry study. *Parasitology research* 77, 651-658.
- Kieffer, C., Skalicky, J.J., Morita, E., De Domenico, I., Ward, D.M., Kaplan, J., and Sundquist, W.I. (2008). Two distinct modes of ESCRT-III recognition are required for VPS4 functions in lysosomal protein targeting and HIV-1 budding. *Developmental cell* 15, 62-73.
- Kim, S.H., Bianco, N., Menon, R., Lechman, E.R., Shufesky, W.J., Morelli, A.E., and Robbins, P.D. (2006). Exosomes derived from genetically modified DC expressing FasL are anti-inflammatory and immunosuppressive. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 13, 289-300.
- Klumperman, J., and Raposo, G. (2014). The complex ultrastructure of the endolysosomal system. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6, a016857.
- Koles, K., and Budnik, V. (2012). Exosomes go with the Wnt. *Cellular logistics* 2, 169-173.
- Kossinova, O.A., Gopanenko, A.V., Tamkovich, S.N., Krasheninina, O.A., Tupikin, A.E., Kiseleva, E., Yanshina, D.D., Malygin, A.A., Ven'yaminova, A.G., Kabilov, M.R., et al. (2017). Cytosolic YB-1 and NSUN2 are the only proteins recognizing specific motifs present in mRNAs enriched in exosomes. *Biochimica et biophysica acta Proteins and proteomics* 1865, 664-673.
- Kucknoor, A.S., Mundodi, V., and Alderete, J.F. (2007). The proteins secreted by *Trichomonas vaginalis* and vaginal epithelial cell response to secreted and episomally expressed AP65. *Cellular microbiology* 9, 2586-2597.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lanfredi-Rangel, A., Attias, M., de Carvalho, T.M., Kattenbach, W.M., and De Souza, W. (1998). The peripheral vesicles of trophozoites of the primitive protozoan *Giardia lamblia* may correspond to early and late endosomes and to lysosomes. *Journal of structural biology* 123, 225-235.
- Langford, T.D., Silberman, J.D., Weiland, M.E., Svard, S.G., McCaffery, J.M., Sogin, M.L., and Gillin, F.D. (2002). *Giardia lamblia*: identification and characterization of Rab and GDI proteins in a genome survey of the ER to Golgi endomembrane system. *Experimental parasitology* 101, 13-24.

- Lee, H.Y., Hyung, S., Lee, N.Y., Yong, T.S., Han, S.H., and Park, S.J. (2012). Excretory-secretory products of *Giardia lamblia* induce interleukin-8 production in human colonic cells via activation of p38, ERK1/2, NF-kappaB and AP-1. *Parasite immunology* 34, 183-198.
- Leung, K.F., Dacks, J.B., and Field, M.C. (2008). Evolution of the multivesicular body ESCRT machinery; retention across the eukaryotic lineage. *Traffic* 9, 1698-1716.
- Leventis, P.A., and Grinstein, S. (2010). The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annual review of biophysics* 39, 407-427.
- Li, P., Kaslan, M., Lee, S.H., Yao, J., and Gao, Z. (2017). Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics* 7, 789-804.
- Lin, Y., Kimpler, L.A., Naismith, T.V., Lauer, J.M., and Hanson, P.I. (2005). Interaction of the mammalian endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) III protein hSnf7-1 with itself, membranes, and the AAA+ ATPase SKD1. *The Journal of biological chemistry* 280, 12799-12809.
- Lindmark, D.G. (1988). *Giardia lamblia*: localization of hydrolase activities in lysosome-like organelles of trophozoites. *Experimental parasitology* 65, 141-147.
- Lindsay, A.J., and McCaffrey, M.W. (2002). Rab11-FIP2 functions in transferrin recycling and associates with endosomal membranes via its COOH-terminal domain. *The Journal of biological chemistry* 277, 27193-27199.
- Lindsay, A.J., and McCaffrey, M.W. (2004). The C2 domains of the class I Rab11 family of interacting proteins target recycling vesicles to the plasma membrane. *Journal of cell science* 117, 4365-4375.
- Lo Cicero, A., Delevoeye, C., Gilles-Marsens, F., Loew, D., Dingli, F., Guere, C., Andre, N., Vie, K., van Niel, G., and Raposo, G. (2015). Exosomes released by keratinocytes modulate melanocyte pigmentation. *Nature communications* 6, 7506.
- Luga, V., and Wrana, J.L. (2013). Tumor-stroma interaction: Revealing fibroblast-secreted exosomes as potent regulators of Wnt-planar cell polarity signaling in cancer metastasis. *Cancer research* 73, 6843-6847.
- Lujan, H.D., and Touz, M.C. (2003). Protein trafficking in *Giardia lamblia*. *Cellular microbiology* 5, 427-434.
- Luzio, J.P., Rous, B.A., Bright, N.A., Pryor, P.R., Mullock, B.M., and Piper, R.C. (2000). Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *Journal of cell science* 113 ( Pt 9), 1515-1524.
- Llorente, A., Skotland, T., Sylvanne, T., Kauhanen, D., Rog, T., Orłowski, A., Vattulainen, I., Ekroos, K., and Sandvig, K. (2013). Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochimica et biophysica acta* 1831, 1302-1309.
- MacKenzie, A., Wilson, H.L., Kiss-Toth, E., Dower, S.K., North, R.A., and Surprenant, A. (2001). Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* 15, 825-835.
- Marcilla, A., Martin-Jaular, L., Trelis, M., de Menezes-Neto, A., Osuna, A., Bernal, D., Fernandez-Becerra, C., Almeida, I.C., and Del Portillo, H.A. (2014). Extracellular vesicles in parasitic diseases. *Journal of extracellular vesicles* 3, 25040.
- Martin-Jaular, L., Nakayasu, E.S., Ferrer, M., Almeida, I.C., and Del Portillo, H.A. (2011). Exosomes from *Plasmodium yoelii*-infected reticulocytes protect mice from lethal infections. *PLoS one* 6, e26588.
- Mathivanan, S., Fahner, C.J., Reid, G.E., and Simpson, R.J. (2012). ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic acids research* 40, D1241-1244.
- Matsuo, H., Chevallier, J., Mayran, N., Le Blanc, I., Ferguson, C., Faure, J., Blanc, N.S., Matile, S., Dubochet, J., Sadoul, R., et al. (2004). Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science* 303, 531-534.

- McMahon, H.T., and Boucrot, E. (2015).** Membrane curvature at a glance. *Journal of cell science* 128, 1065-1070.
- Midlej, V., de Souza, W., and Benchimol, M. (2019).** The peripheral vesicles gather multivesicular bodies with different behavior during the *Giardia intestinalis* life cycle. *Journal of structural biology* 207, 301-311.
- Monis, P.T., Andrews, R.H., Mayrhofer, G., and Ey, P.L. (2003).** Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 3, 29-38.
- Morrison, H.G., McArthur, A.G., Gillin, F.D., Aley, S.B., Adam, R.D., Olsen, G.J., Best, A.A., Cande, W.Z., Chen, F., Cipriano, M.J., et al. (2007).** Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science* 317, 1921-1926.
- Moyano, S., Musso, J., Feliziani, C., Zamponi, N., Frontera, L.S., Ropolo, A.S., Lanfredi-Rangel, A., Lalle, M., and Touz, M. (2019).** Exosome Biogenesis in the Protozoa Parasite *Giardia lamblia*: A Model of Reduced Interorganellar Crosstalk. *Cells* 8.
- Nash, T.E., Herrington, D.A., Losonsky, G.A., and Levine, M.M. (1987).** Experimental human infections with *Giardia lamblia*. *The Journal of infectious diseases* 156, 974-984.
- Nickerson, D.P., Russell, M.R., and Odorizzi, G. (2007).** A concentric circle model of multivesicular body cargo sorting. *EMBO reports* 8, 644-650.
- Nievas, Y.R., Coceres, V.M., Midlej, V., de Souza, W., Benchimol, M., Pereira-Neves, A., Vashisht, A.A., Wohlschlegel, J.A., Johnson, P.J., and de Miguel, N. (2018).** Membrane-shed vesicles from the parasite *Trichomonas vaginalis*: characterization and their association with cell interaction. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 75, 2211-2226.
- Nolan, S., Dixon, R., Norman, K., Hellewell, P., and Ridger, V. (2008).** Nitric oxide regulates neutrophil migration through microparticle formation. *The American journal of pathology* 172, 265-273.
- Odorizzi, G. (2006).** The multiple personalities of Alix. *Journal of cell science* 119, 3025-3032.
- Ortega-Pierres, M.G., and Arguello-Garcia, R. (2019).** *Giardia duodenalis*: Role of secreted molecules as virulent factors in the cytotoxic effect on epithelial cells. *Advances in parasitology* 106, 129-169.
- Ostrowski, M., Carmo, N.B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C.F., Schauer, K., Hume, A.N., Freitas, R.P., et al. (2010).** Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature cell biology* 12, 19-30; sup pp 11-13.
- Palm, J.E., Weiland, M.E., Griffiths, W.J., Ljungstrom, I., and Svard, S.G. (2003).** Identification of immunoreactive proteins during acute human giardiasis. *The Journal of infectious diseases* 187, 1849-1859.
- Pavelka, N., Fournier, M.L., Swanson, S.K., Pelizzola, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Florens, L., and Washburn, M.P. (2008).** Statistical similarities between transcriptomics and quantitative shotgun proteomics data. *Mol Cell Proteomics* 7, 631-644.
- Pavelka, N., Pelizzola, M., Vizzardelli, C., Capozzoli, M., Splendiani, A., Granucci, F., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2004).** A power law global error model for the identification of differentially expressed genes in microarray data. *BMC Bioinformatics* 5, 203.
- Peake, P.W., Pianta, T.J., Succar, L., Fernando, M., Pugh, D.J., McNamara, K., and Endre, Z.H. (2014).** A comparison of the ability of levels of urinary biomarker proteins and exosomal mRNA to predict outcomes after renal transplantation. *PloS one* 9, e98644.
- Peden, A.A., Schonteich, E., Chun, J., Junutula, J.R., Scheller, R.H., and Prekeris, R. (2004).** The RCP-Rab11 complex regulates endocytic protein sorting. *Molecular biology of the cell* 15, 3530-3541.

- Pegtel, D.M., Peferoen, L., and Amor, S. (2014). Extracellular vesicles as modulators of cell-to-cell communication in the healthy and diseased brain. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 369.
- Perez-Hernandez, D., Gutierrez-Vazquez, C., Jorge, I., Lopez-Martin, S., Ursa, A., Sanchez-Madrid, F., Vazquez, J., and Yanez-Mo, M. (2013). The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *The Journal of biological chemistry* 288, 11649-11661.
- Pisitkun, T., Johnstone, R., and Knepper, M.A. (2006). Discovery of urinary biomarkers. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 5, 1760-1771.
- Profeta, G.S., Dos Reis, C.V., Santiago, A.D.S., Godoi, P.H.C., Fala, A.M., Wells, C.I., Sartori, R., Salmazo, A.P.T., Ramos, P.Z., Massirer, K.B., *et al.* (2019). Binding and structural analyses of potent inhibitors of the human Ca(2+)/calmodulin dependent protein kinase kinase 2 (CAMKK2) identified from a collection of commercially-available kinase inhibitors. *Scientific reports* 9, 16452.
- Prucca, C.G., Slavin, I., Quiroga, R., Elias, E.V., Rivero, F.D., Saura, A., Carranza, P.G., and Lujan, H.D. (2008). Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. *Nature* 456, 750-754.
- Qu, L., Ding, J., Chen, C., Wu, Z.J., Liu, B., Gao, Y., Chen, W., Liu, F., Sun, W., Li, X.F., *et al.* (2016). Exosome-Transmitted IncARSR Promotes Sunitinib Resistance in Renal Cancer by Acting as a Competing Endogenous RNA. *Cancer cell* 29, 653-668.
- Raiborg, C., and Stenmark, H. (2009). The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* 458, 445-452.
- Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J., and Geuze, H.J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 183, 1161-1172.
- Raposo, G., and Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of cell biology* 200, 373-383.
- Ratajczak, J., Wysoczynski, M., Hayek, F., Janowska-Wieczorek, A., and Ratajczak, M.Z. (2006). Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* 20, 1487-1495.
- Record, M., Carayon, K., Poirot, M., and Silvente-Poirot, S. (2014). Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes. *Biochimica et biophysica acta* 1841, 108-120.
- Reddy, V.S., Madala, S.K., Trinath, J., and Reddy, G.B. (2018). Extracellular small heat shock proteins: exosomal biogenesis and function. *Cell stress & chaperones* 23, 441-454.
- Ringqvist, E., Palm, J.E., Skarin, H., Hehl, A.B., Weiland, M., Davids, B.J., Reiner, D.S., Griffiths, W.J., Eckmann, L., Gillin, F.D., *et al.* (2008). Release of metabolic enzymes by *Giardia* in response to interaction with intestinal epithelial cells. *Molecular and biochemical parasitology* 159, 85-91.
- Rivero, M.R., Kulakova, L., and Touz, M.C. (2010). Long double-stranded RNA produces specific gene downregulation in *Giardia lamblia*. *J Parasitol* 96, 815-819.
- Rosa-Fernandes, L., Rocha, V.B., Carregari, V.C., Urbani, A., and Palmisano, G. (2017). A Perspective on Extracellular Vesicles Proteomics. *Frontiers in chemistry* 5, 102.
- Roxstrom-Lindquist, K., Jerlstrom-Hultqvist, J., Jorgensen, A., Troell, K., Svard, S.G., and Andersson, J.O. (2010). Large genomic differences between the morphologically indistinguishable diplomonads *Spironucleus barkhanus* and *Spironucleus salmonicida*. *BMC genomics* 11, 258.

- Saha, N., Dutta, S., Datta, S.P., and Sarkar, S. (2018). The minimal ESCRT machinery of *Giardia lamblia* has altered inter-subunit interactions within the ESCRT-II and ESCRT-III complexes. *European journal of cell biology* 97, 44-62.
- Santangelo, L., Giurato, G., Cicchini, C., Montaldo, C., Mancone, C., Tarallo, R., Battistelli, C., Alonzi, T., Weisz, A., and Tripodi, M. (2016). The RNA-Binding Protein SYNCRIP Is a Component of the Hepatocyte Exosomal Machinery Controlling MicroRNA Sorting. *Cell reports* 17, 799-808.
- Savina, A., Vidal, M., and Colombo, M.I. (2002). The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *Journal of cell science* 115, 2505-2515.
- Savioli, L., Smith, H., and Thompson, A. (2006). *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends in parasitology* 22, 203-208.
- Scott, A., Chung, H.Y., Gonciarz-Swiatek, M., Hill, G.C., Whitby, F.G., Gaspar, J., Holton, J.M., Viswanathan, R., Ghaffarian, S., Hill, C.P., *et al.* (2005a). Structural and mechanistic studies of VPS4 proteins. *The EMBO journal* 24, 3658-3669.
- Scott, A., Gaspar, J., Stuchell-Breton, M.D., Alam, S.L., Skalicky, J.J., and Sundquist, W.I. (2005b). Structure and ESCRT-III protein interactions of the MIT domain of human VPS4A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 13813-13818.
- Scheuring, S., Rohricht, R.A., Schoning-Burkhardt, B., Beyer, A., Muller, S., Abts, H.F., and Kohrer, K. (2001). Mammalian cells express two VPS4 proteins both of which are involved in intracellular protein trafficking. *J Mol Biol* 312, 469-480.
- Schorey, J.S., Cheng, Y., Singh, P.P., and Smith, V.L. (2015). Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO reports* 16, 24-43.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68, 850-858.
- Shurtleff, M.J., Temoche-Diaz, M.M., Karfilis, K.V., Ri, S., and Schekman, R. (2016). Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction. *eLife* 5.
- Silverman, J.M., Clos, J., Horakova, E., Wang, A.Y., Wiesgigl, M., Kelly, I., Lynn, M.A., McMaster, W.R., Foster, L.J., Levings, M.K., *et al.* (2010). *Leishmania* exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells. *Journal of immunology* 185, 5011-5022.
- Silverman, J.M., Chan, S.K., Robinson, D.P., Dwyer, D.M., Nandan, D., Foster, L.J., and Reiner, N.E. (2008). Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome biology* 9, R35.
- Silverman, J.M., and Reiner, N.E. (2011). Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. *Cellular microbiology* 13, 1-9.
- Simons, K., and Sampaio, J.L. (2011). Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3, a004697.
- Sims, P.J., Faioni, E.M., Wiedmer, T., and Shattil, S.J. (1988). Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *The Journal of biological chemistry* 263, 18205-18212.
- Sinha, A., Mandal, S., Banerjee, S., Ghosh, A., Ganguly, S., Sil, A.K., and Sarkar, S. (2011). Identification and characterization of a FYVE domain from the early diverging eukaryote *Giardia lamblia*. *Current microbiology* 62, 1179-1184.
- Skarin, H., Ringqvist, E., Hellman, U., and Svard, S.G. (2011). Elongation factor 1-alpha is released into the culture medium during growth of *Giardia intestinalis* trophozoites. *Experimental parasitology* 127, 804-810.

- Skotland, T., Sandvig, K., and Llorente, A. (2017). Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Progress in lipid research* 66, 30-41.
- Slagsvold, T., Pattni, K., Malerod, L., and Stenmark, H. (2006). Endosomal and non-endosomal functions of ESCRT proteins. *Trends in cell biology* 16, 317-326.
- Slavin, I., Saura, A., Carranza, P.G., Touz, M.C., Nores, M.J., and Lujan, H.D. (2002). Dephosphorylation of cyst wall proteins by a secreted lysosomal acid phosphatase is essential for excystation of *Giardia lamblia*. *Molecular and biochemical parasitology* 122, 95-98.
- Sobajima, T., Yoshimura, S.I., Maeda, T., Miyata, H., Miyoshi, E., and Harada, A. (2018). The Rab11-binding protein RELCH/KIAA1468 controls intracellular cholesterol distribution. *The Journal of cell biology* 217, 1777-1796.
- Sogin, M.L., Gunderson, J.H., Elwood, H.J., Alonso, R.A., and Peattie, D.A. (1989). Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science* 243, 75-77.
- Statello, L., Maugeri, M., Garre, E., Nawaz, M., Wahlgren, J., Papadimitriou, A., Lundqvist, C., Lindfors, L., Collen, A., Sunnerhagen, P., *et al.* (2018). Identification of RNA-binding proteins in exosomes capable of interacting with different types of RNA: RBP-facilitated transport of RNAs into exosomes. *PLoS one* 13, e0195969.
- Staubach, S., Razawi, H., and Hanisch, F.G. (2009). Proteomics of MUC1-containing lipid rafts from plasma membranes and exosomes of human breast carcinoma cells MCF-7. *Proteomics* 9, 2820-2835.
- Stuchell-Breton, M.D., Skalicky, J.J., Kieffer, C., Karren, M.A., Ghaffarian, S., and Sundquist, W.I. (2007). ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases. *Nature* 449, 740-744.
- Stuffers, S., Sem Wegner, C., Stenmark, H., and Brech, A. (2009). Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic* 10, 925-937.
- Subra, C., Laulagnier, K., Perret, B., and Record, M. (2007). Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie* 89, 205-212.
- Thakur, B.K., Zhang, H., Becker, A., Matei, I., Huang, Y., Costa-Silva, B., Zheng, Y., Hoshino, A., Brazier, H., Xiang, J., *et al.* (2014). Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell research* 24, 766-769.
- Thery, C. (2011). Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *FEBS journal* 274, 15-32.
- Thery, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current protocols in cell biology* Chapter 3, Unit 3 22.
- Thery, C., Gho, Y.S., and Quesenberry, P. (2019). Journal of extracellular vesicles: the seven year itch! *Journal of extracellular vesicles* 8, 1654729.
- Thery, C., Witwer, K.W., Aikawa, E., Alcaraz, M.J., Anderson, J.D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G.K., *et al.* (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of extracellular vesicles* 7, 1535750.
- Thompson, R.C., Hopkins, R.M., and Homan, W.L. (2000). Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitology today* 16, 210-213.
- Thompson, R.C., and Monis, P.T. (2004). Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Advances in parasitology* 58, 69-137.
- Tkach, M., and Thery, C. (2016). Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell* 164, 1226-1232.

- Touz, M.C., Conrad, J.T., and Nash, T.E. (2005)**. A novel palmitoyl acyl transferase controls surface protein palmitoylation and cytotoxicity in *Giardia lamblia*. *Molecular microbiology* 58, 999-1011.
- Touz, M.C., Kulakova, L., and Nash, T.E. (2004)**. Adaptor protein complex 1 mediates the transport of lysosomal proteins from a Golgi-like organelle to peripheral vacuoles in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Molecular biology of the cell* 15, 3053-3060.
- Touz, M.C., Lujan, H.D., Hayes, S.F., and Nash, T.E. (2003)**. Sorting of encystation-specific cysteine protease to lysosome-like peripheral vacuoles in *Giardia lamblia* requires a conserved tyrosine-based motif. *The Journal of biological chemistry* 278, 6420-6426.
- Touz, M.C., Nores, M.J., Slavin, I., Piacenza, L., Acosta, D., Carmona, C., and Lujan, H.D. (2002)**. Membrane-associated dipeptidyl peptidase IV is involved in encystation-specific gene expression during *Giardia* differentiation. *Biochem J* 364, 703-710.
- Touz, M.C., Rivero, M.R., Miras, S.L., and Bonifacino, J.S. (2012)**. Lysosomal protein trafficking in *Giardia lamblia*: common and distinct features. *Front Biosci (Elite Ed)* 4, 1898-1909.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979)**. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brugger, B., and Simons, M. (2008)**. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319, 1244-1247.
- Turchany, J.M., McCaffery, J.M., Aley, S.B., and Gillin, F.D. (1997)**. Ultrastructural effects of lactoferrin binding on *Giardia lamblia* trophozoites. *The Journal of eukaryotic microbiology* 44, 68-72.
- Twu, O., de Miguel, N., Lustig, G., Stevens, G.C., Vashisht, A.A., Wohlschlegel, J.A., and Johnson, P.J. (2013)**. *Trichomonas vaginalis* exosomes deliver cargo to host cells and mediate host-parasite interactions. *PLoS pathogens* 9, e1003482.
- Ullu, E., Djikeng, A., Shi, H., and Tschudi, C. (2002)**. RNA interference: advances and questions. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 357, 65-70.
- Upadhy, D., and Shetty, A.K. (2019)**. Promise of extracellular vesicles for diagnosis and treatment of epilepsy. *Epilepsy & behavior : E&B*, 106499.
- Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J.J., and Lotvall, J.O. (2007)**. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology* 9, 654-659.
- Vale, R.D. (2000)**. AAA proteins. Lords of the ring. *The Journal of cell biology* 150, F13-19.
- van der Pol, E., Boing, A.N., Harrison, P., Sturk, A., and Nieuwland, R. (2012)**. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacological reviews* 64, 676-705.
- van der Vlist, E.J., Arkesteijn, G.J., van de Lest, C.H., Stoorvogel, W., Nolte-'t Hoen, E.N., and Wauben, M.H. (2012)**. CD4(+) T cell activation promotes the differential release of distinct populations of nanosized vesicles. *Journal of extracellular vesicles* 1.
- van Niel, G., Charrin, S., Simoes, S., Romao, M., Rochin, L., Saftig, P., Marks, M.S., Rubinstein, E., and Raposo, G. (2011)**. The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Developmental cell* 21, 708-721.
- van Niel, G., Raposo, G., Candalh, C., Bousac, M., Hershberg, R., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. (2001)**. Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* 121, 337-349.

- Villarroya-Beltri, C., Gutierrez-Vazquez, C., Sanchez-Cabo, F., Perez-Hernandez, D., Vazquez, J., Martin-Cofreces, N., Martinez-Herrera, D.J., Pascual-Montano, A., Mittelbrunn, M., and Sanchez-Madrid, F. (2013a). Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nature communications* 4, 2980.
- Villarroya-Beltri, C., Gutierrez-Vazquez, C., Sanchez-Madrid, F., and Mittelbrunn, M. (2013b). Analysis of microRNA and protein transfer by exosomes during an immune synapse. *Methods in molecular biology* 1024, 41-51.
- Vlassov, A.V., Magdaleno, S., Setterquist, R., and Conrad, R. (2012). Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica et biophysica acta* 1820, 940-948.
- Williams, R.L., and Urbe, S. (2007). The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 355-368.
- Willms, E., Cabanas, C., Mager, I., Wood, M.J.A., and Vader, P. (2018). Extracellular Vesicle Heterogeneity: Subpopulations, Isolation Techniques, and Diverse Functions in Cancer Progression. *Frontiers in immunology* 9, 738.
- Willms, E., Johansson, H.J., Mager, I., Lee, Y., Blomberg, K.E., Sadik, M., Alaarg, A., Smith, C.I., Lehtio, J., El Andaloussi, S., et al. (2016). Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Scientific reports* 6, 22519.
- Wolf, P. (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. *British journal of haematology* 13, 269-288.
- Wong, W.K., Tan, Z.N., Othman, N., Lim, B.H., Mohamed, Z., Olivos Garcia, A., and Noordin, R. (2011). Analysis of *Entamoeba histolytica* excretory-secretory antigen and identification of a new potential diagnostic marker. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 18, 1913-1917.
- Wyciszkievicz, A., Kalinowska-Lyszczarz, A., Nowakowski, B., Kazmierczak, K., Osztynowicz, K., and Michalak, S. (2019). Expression of small heat shock proteins in exosomes from patients with gynecologic cancers. *Scientific reports* 9, 9817.
- Xiao, J., Xia, H., Yoshino-Koh, K., Zhou, J., and Xu, Z. (2007). Structural characterization of the ATPase reaction cycle of endosomal AAA protein Vps4. *Journal of molecular biology* 374, 655-670.
- Xiao, J., Xia, H., Zhou, J., Azmi, I.F., Davies, B.A., Katzmann, D.J., and Xu, Z. (2008). Structural basis of Vta1 function in the multivesicular body sorting pathway. *Developmental cell* 14, 37-49.
- Yanez-Mo, M., Siljander, P.R., Andreu, Z., Zavec, A.B., Borrás, F.E., Buzas, E.I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., et al. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of extracellular vesicles* 4, 27066.
- Yang, D., and Hurley, J.H. (2010). Structural role of the Vps4-Vta1 interface in ESCRT-III recycling. *Structure* 18, 976-984.
- Yang, M., Coppens, I., Wormsley, S., Baevova, P., Hoppe, H.C., and Joiner, K.A. (2004). The *Plasmodium falciparum* Vps4 homolog mediates multivesicular body formation. *Journal of cell science* 117, 3831-3838.
- Yaron, S., Kolling, G.L., Simon, L., and Matthews, K.R. (2000). Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. *Applied and environmental microbiology* 66, 4414-4420.
- Yuyama, K., Sun, H., Usuki, S., Sakai, S., Hanamatsu, H., Mioka, T., Kimura, N., Okada, M., Tahara, H., Furukawa, J., et al. (2015). A potential function for neuronal exosomes: sequestering intracerebral amyloid-beta peptide. *FEBS letters* 589, 84-88.
- Zhang, H.D., Jiang, L.H., Hou, J.C., Zhong, S.L., Zhu, L.P., Wang, D.D., Zhou, S.Y., Yang, S.J., Wang, J.Y., Zhang, Q., et al. (2018). Exosome: a novel mediator in drug resistance of cancer cells. *Epigenomics* 10, 1499-1509.

**-Zhang, J., Li, S., Li, L., Li, M., Guo, C., Yao, J., and Mi, S. (2015).** Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics, proteomics & bioinformatics* 13, 17-24.

**-Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., and Amigorena, S. (1998).** Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nature medicine* 4, 594-600.