

Universidad
Nacional
de San Martín

Caracterización de la división celular del parásito *Tritrichomonas foetus*

Ing. en Agrobiotecnología Iriarte Lucrecia

Directora: Dra Veronica Coceres

Co-directora: Dra Natalia de Miguel

Laboratorio de Parásitos Anaerobios (INTECH)

**Trabajo de tesis doctoral para optar al título de Doctora en
Biología Molecular y
Biotecnología**

2024

Iriarte Lucrecia

Coceres Veronica

De Miguel Natalia

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por la beca otorgada para realizar el doctorado.

A Veronica Coceres, mi directora. Gracias por permitirme formarme al lado tuyo durante todos estos años, tesina y doctorados. Gracias por todo lo que me enseñaste, pero principalmente por tu comprensión y empatía dentro y fuera del laboratorio. ¡MUCHAS GRACIAS!

A Natalia de Miguel, mi co-directora. Gracias por permitirme llevar adelante el doctorado en laboratorio; gracias por cada sugerencia, idea, corrección que permitieron mejorar mi trabajo.

A Andrés Alonso (Beto). Gracias por tu colaboración en la parte informática de la tesis, fue de gran ayuda.

A mis compañeros de laboratorio (pilares sumamente importantes en todos estos años). Nehuen y Aye, a quienes ya no están, pero con quienes compartiste tiempo, gracias por la ayuda, los momentos de mate, las charlas y esos memes divertidos que compartimos a través de WhatsApp. A Manu y Dani gracias por estar dispuestas siempre a ayudar, gracias por los mates y las charlas en el laboratorio. A las nuevas adquisiciones Agus y Juli, gracias por su buena onda y por permitirme ayudarlas, es también parte de mi formación.

Párrafo aparte para el “team” foetus (equipo liderado por Vero). Cristian, Martin y Lorenzo gracias por compartir más o menos tiempo el trabajo en el laboratorio conmigo intentando descifrar algo sobre este parásito.

A las chicas de UB2 (Agus, Lau, Coti y Ana). Gracias por todos los almuerzos compartidos; momento de charla, catarsis y risas. A Pato, por las charlas matutinas en el viaje hacia el INTECH

A todos los integrantes de LBD (todos lo que estuvieron durante estos años). Gracias por su predisposición a ayudarme cada vez que lo necesite.

A todo personal del INTECH que de alguna u otra forma hizo posible mi formación y el desarrollo de mi doctorado.

A Rama, mi compañero de vida. Gracias por tu apoyo durante todos estos años. Gracias por todos los fines de semana que me acompañaste al INTECH. Gracias por escucharme, aunque muchas veces no entendieras de lo que te estaba hablando. Gracias por el AGUANTE durante la escritura de la tesis.

A mis hijas, Emma y Anna, las cuales se bancan el tiempo de mamá fuera de casa, las idas los fines de semana al instituto y las horas de mamá en la compu. Las amo

A mi mamá y papá por todo. Por estar siempre al pie del cañón para mí y mi familia. Gracias por hacer el esfuerzo para que yo estudiara.

Al resto de mi familia; abuela Sara y Luisi por cuidar de Emma y Anna y que yo pudiera estar súper tranquila trabajando. A mis hermanos y familia por siempre estar ahí para ayudar y preguntar cuando voy a dejar de estudiar jejeej

Durante su formación académica la postulante participó en las siguientes publicaciones científicas:

" Prolonged survival of venereal *Tritrichomonas foetus* parasite in the gastrointestinal tract, bovine fecal extract, and water". **Iriarte LS**, Martínez CI, Salas N, Alonso AM, Pruzzo C, Tuane dos Santos Melo, Pereira-Neves A, de Miguel N, Coceres VM. Microbiology Spectrum. 2023 Dec 12;11(6): e0042923. doi: 10.1128/spectrum.00429-23.

"*Tritrichomonas foetus* Cell Division Involves DNA Endoreplication and Multiple Fissions". **Iriarte LS**, Martinez CI, de Miguel N, Coceres VM. Microbiology Spectrum., 2 February. doi: 10.1128/spectrum.03251-22.

"Ultrastructural and Functional Analysis of a Novel Extra-Axonemal Structure in Parasitic Trichomonads". Coceres VM, **Iriarte LS**, Miranda-Magalhães A, Santos de Andrade TA, de Miguel N, Pereira Neves A. Front. Cell. Infect. Microbiol., 09 November 2021. doi: 10.3389/fcimb.2021.757185.

"TfVPS32 protein role in cytokinesis process of *Tritrichomonas foetus*". **Iriarte LS**, Moros Duarte D, Midlej V, Frontera L, Barbeito C, Benchimol M, de Miguel N, Coceres VM. Journal of Eukaryotic Microbiology. (2017) May. doi: 10.1111/jeu.12424.

ABREVIATURAS

BrdU: 5-bromo-2-desoxiuridina

BSA: Albúmina sérica bovina

CF: Contraste de fase

CFW: Calcofluor White

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

EpNeo: Vector de expresión utilizado en trichomonas (vacío)

FSC: *Forward Scatter* o detector de dispersión frontal en el citómetro de flujo

IFA: Inmunofluorescencia indirecta

IP: Ioduro de propidio

MEN: Red de salida de la mitosis

MOB: Proteína Mps One Binder

MTOCs: Centros organizadores de microtúbulos

PAF: Paraformaldehído

PBS: Tampón fosfato salino

PCNA: Antígeno nuclear de células en proliferación

PDVF: Fluoruro de polivinilideno

qPCR: PCR en tiempo real

RNAseq: Secuenciación del transcriptoma entero

SDS-PAGE: Acrónimo en inglés de *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SE: Suero de equino adulto

SFB: Suero fetal bovino

SIN: Red de iniciación de la septación

SPB: *Spindle pole body* (cuerpo polar del huso)

SSC: *Side Scatter* o detectores de dispersión lateral en el citómetro de flujo

TYM: Medio de cultivo a base de triptosa, extracto de levadura y maltosa

ARNm: ARN mensajero

ARNi: ARN de interferencia

Contenido

RESUMEN	9
SUMMARY	10
INTRODUCCIÓN	12
<i>Tritrichomonas foetus</i>	12
Tritrichomonosis bovina.....	14
Tritrichomonosis felina.....	17
Ciclo celular	17
Replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN)	21
División celular de <i>Tritrichomonas foetus</i>	24
OBJETIVOS	25
Objetivo general.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Cultivos de parásitos	26
Ensayo de crecimiento de parásitos	26
Tinción de núcleos de <i>T. foetus</i>	26
Ensayo de inmunolocalización	27
Inmunoelectromicroscopía de transmisión.....	27
Tinción con Calcofluor white	27
Citometría de flujo	28
Depleción y privación de nutrientes.....	28
Análisis del egreso de parásitos multinucleados	29
Incorporación de BrdU (5-bromo-2-desoxiuridina)	29
Tratamiento con colchicina	29
Clonado en vector de expresión de Trichomonas	30
Transfección de parásitos.....	30
SDS-PAGE y Western blot.....	31
PCR en tiempo real.....	31
Obtención de ARN total para secuenciamiento de transcritos (RNA seq).....	32
Análisis de la expresión diferencial de genes	32
RESULTADOS DEL CAPÍTULO 1	33
<i>T. foetus</i> presenta un número variable de núcleos en condiciones estándar de cultivo	33
La depleción de nutrientes induce la formación de <i>T. foetus</i> multinucleados	36

La fisión múltiple ocurre durante la división celular de <i>T. foetus</i>	40
La privación de nutrientes induce la formación de parásitos esféricos con un solo núcleo de mayor tamaño.....	44
La endoreplicación del genoma puede ocurrir durante el ciclo celular de <i>T. foetus</i>	48
Identificación de posibles genes involucrados en el proceso de endoreplicación del ADN en <i>T. foetus</i>	49
DISCUSIÓN DEL CAPITULO 1	54
INTRODUCCIÓN DEL CAPÍTULO 2	57
Vía Hippo y sus contrapartes MEN/SIN	57
Puntos de control del ciclo celular y las vías Hippo/MEN/SIN	60
Proteínas MOB (Monopolar spindle One Binder).....	62
Vía Hippo y endoreplicación del ADN.....	63
MOB1 en protozoarios	64
RESULTADOS DEL CAPÍTULO 2	66
El genoma de <i>Tritrichomonas foetus</i> codifica para dos proteínas MOB	66
La proteína TfMOB1 presenta localización nuclear y citosólica; mientras que TfMOB2 se localiza únicamente en el citosol	68
La expresión y la localización subcelular de TfMOB1 varían durante el ciclo celular de <i>T. foetus</i>	70
El gen <i>Tfmob1</i> presenta una expresión diferencial en condiciones de estrés nutricional	73
Las proteínas TfMOB1FL y TfMOB1ΔNt se localizan en el núcleo y en el citoplasma	74
La sobreexpresión de la proteína TfMOB1FL afecta el crecimiento de <i>T. foetus</i>	75
Parásitos TfMOB1FL no aumentan su contenido de ADN en condiciones de estrés nutricional ..	78
CONSIDERACIONES FINALES	85
BIBLIOGRAFIA	86

RESUMEN

Tritrichomonas foetus (*T. foetus*) es un protista flagelado anaerobio que exhibe un estilo de vida extracelular. Este organismo se encuentra comúnmente en el tracto urogenital de los bovinos, siendo el agente causal de la Tritrichomonosis bovina. Además, *T. foetus* también es responsable de la tritrichomonosis en felinos. La plasticidad única de su protoplasma permite a *T. foetus* adoptar dos formas distintas en respuesta a las condiciones ambientales. En condiciones favorables, presenta una forma de trofozoíto, que es la fase activa y móvil del parásito. En contraste, cuando las condiciones no son propicias, *T. foetus* puede transformarse en una forma de pseudoquiste, una estructura resistente que le permite sobrevivir en ambientes menos favorables. *T. foetus* se reproduce de forma asexual, específicamente mediante fisión binaria longitudinal, para dar origen a dos células hijas idénticas. Sin embargo, en condiciones de cultivo estándar se observan células multinucleadas, un fenotipo que no concuerda con el proceso típico de fisión binaria. Dadas estas observaciones y el limitado conocimiento sobre el proceso de división celular del parásito en el capítulo 1, nos propusimos caracterizar detalladamente el proceso de división celular de *T. foetus*. Dentro de los resultados obtenidos, observamos que *T. foetus* no solo se reproduce mediante fisión binaria longitudinal, sino que también realiza fisión múltiple. Además, notamos la presencia de células multinucleadas, y es interesante destacar que este fenotipo se incrementa notablemente en condiciones de estrés nutricional. Por último, confirmamos que la presencia de células multinucleadas se origina a partir de endociclos (ciclos celulares alternativos) que permiten la endoreplicación del ADN. Durante estos endociclos en ADN se replica, pero no se lleva adelante la división celular. Como consecuencia se obtienen células con un mayor contenido de ADN dispuesto en uno o más núcleos.

Las vías "Hippo" son sistemas de señalización conservados evolutivamente, que controlan la proliferación celular y la morfogénesis en otros tipos celulares. MOB1 es una proteína de la vía Hippo y es clave para la salida de la mitosis; siendo relevante para la correcta transición de la metafase a la anafase; así como también para el equilibrio entre la proliferación y la muerte celular. En este contexto, en el capítulo 2 nos propusimos evaluar el rol de la proteína TfMOB1 en el ciclo celular de este protozoario. En este capítulo observamos que TfMOB1 se localiza en el citoplasma y el núcleo; y que dicha localización es variable dependiendo de las fases del ciclo celular. Por otro lado, demostramos que existe una expresión diferencial de *Tfmob1* durante las fases del ciclo celular; siendo más altos los niveles de expresión en parásitos durante división activa. Llevando ensayos de sobreexpresión pudimos evidenciar que la sobreexpresión de TfMOB1 provocó una disminución en la tasa de crecimiento y aumentó el porcentaje de parásitos en división. Corroborando una función de TfMOB1 en la regulación de la división celular del parásito. Por último y en relación al proceso de endoreplicación del ADN de *T. foetus* nuestros

resultados nos sugieren que es necesario que Tfmob1 se encuentre en niveles bajo de expresión durante este ciclo alternativo.

Palabras claves: *Tritrichomonas foetus*, división celular, endoreplicación, proteína MOB1.

SUMMARY

Tritrichomonas foetus (*T. foetus*) is an anaerobic flagellated protist that exhibits an extracellular lifestyle. Commonly found in the urogenital tract of cattle, it is the causative agent of bovine trichomonosis. Additionally, *T. foetus* is responsible for trichomonosis in felines. The unique plasticity of its protoplasm allows *T. foetus* to adopt two distinct forms in response to environmental conditions. Under favorable conditions, it takes on a trophozoite form, the active and mobile phase of the parasite. In contrast, when conditions are unfavorable, *T. foetus* can transform into a pseudocyst form, a resistant structure allowing survival in less favorable environments. *T. foetus* reproduces asexually, specifically through longitudinal binary fission, giving rise to two identical daughter cells. However, under standard culture conditions, multinucleated cells are observed, a phenotype inconsistent with typical binary fission. Given these observations and limited knowledge of the parasite's cell division process in Chapter 1, our goal was to characterize *T. foetus*'s cell division process in detail. Results revealed that *T. foetus* not only reproduces through longitudinal binary fission but also undergoes multiple fission. Additionally, the presence of multinucleated cells, notably increased under nutritional stress conditions, was observed. Finally, we confirmed that multinucleated cells originate from endocycles (alternative cell cycles) allowing DNA endoreplication, resulting in cells with increased DNA content in one or more nuclei.

The "Hippo" pathways are evolutionarily conserved signaling systems controlling cell proliferation and morphogenesis in various cell types. MOB1 is a protein in the Hippo pathway crucial for mitotic exit, relevant for the transition from metaphase to anaphase, and maintaining the balance between cell proliferation and death. In Chapter 2, we aimed to evaluate the role of the protein TFMOB1 in the cell cycle of this protozoan. The chapter revealed that TfMOB1 is present in the cytoplasm and nucleus, with variable localization depending on the cell cycle phases. Furthermore, differential expression of *Tfmob1* during cell cycle phases was demonstrated, with higher expression levels in actively dividing parasites. Overexpression assays showed that TfMOB1 overexpression led to reduced growth rates and an increased percentage of parasites in division, supporting a role for TfMOB1 in regulating the parasite's cell division. Lastly, concerning *T. foetus* DNA

endoreplication, our results suggest that low expression levels of *Tfmob1* are necessary during this alternative cycle.

Keywords: *Tritrichomonas foetus*, cell division, endoreplication, MOB1 protein.

INTRODUCCIÓN

Tritrichomonas foetus

Tritrichomonas foetus (*T. foetus*) es un protista anaerobio flagelado y de vida extracelular, que se encuentra en el tracto urogenital de los bovinos y es el agente causal de la Tritrichomonosis bovina; una enfermedad de transmisión venérea de distribución mundial ¹. Dicho protozoario es además el responsable de infecciones del tracto gastrointestinal de los gatos domésticos, y se ha reportado como comensal de la cavidad nasal, los intestinos y el estómago de los cerdos ²; lo que demuestra la capacidad que posee este microorganismo de adaptarse a diferentes hospedadores. Taxonómicamente, *T. foetus* forma parte del grupo Parabasalia, del género Tritrichomonas, de la familia Trichomonadidae, de la clase Phytomastigophorea y del phylum Sarcomastigophora. *T. foetus* presenta una forma infectiva denominada trofozoíto cuyo tamaño varía de 9 a 18 µm de largo x 4 a 8 µm de ancho ³(**Fig. 1**). Posee tres flagelos anteriores o apicales que se originan a partir de estructuras denominadas cuerpos basales; y un cuarto flagelo (flagelo recurrente) que se dirige hacia la parte posterior unido al soma mediante una estructura denominada “membrana ondulante” (prolongación de la membrana plasmática); y termina en un extremo libre que se extiende más allá del soma del protozoario ^{4 5} (**Fig. 1**).

Entre las particularidades que presentan estos microorganismos que los diferencian de los demás, se encuentra el citoesqueleto; el cual está conformado por la **pelta** (estructura constituida por microtúbulos que se encuentra en la región anterior de la célula y provee de sostén a la pared del canal flagelar), la **costa** (estructura rígida que protege a la membrana plasmática de las fuerzas producidas por el movimiento de la membrana ondulante) y el **axostilo** ⁶. Particularmente, el axostilo está formado por microtúbulos, recorre longitudinalmente al parásito y se le atribuyen dos funciones principales: la del soporte estructural y la participación activa durante la división celular (facilita la constricción del núcleo durante la cariocinesis y participa en la separación final de las dos células hijas durante la fisión binaria longitudinal) ⁷. Por otro lado, otra característica peculiar de este microorganismo es la presencia de hidrogenosomas u organelas especializadas en producir energía en condiciones anaeróbicas; las cuales utilizan el hidrógeno como aceptor final de electrones y reemplazan funcionalmente a las mitocondrias presentes en otros organismos ^{8 9}.

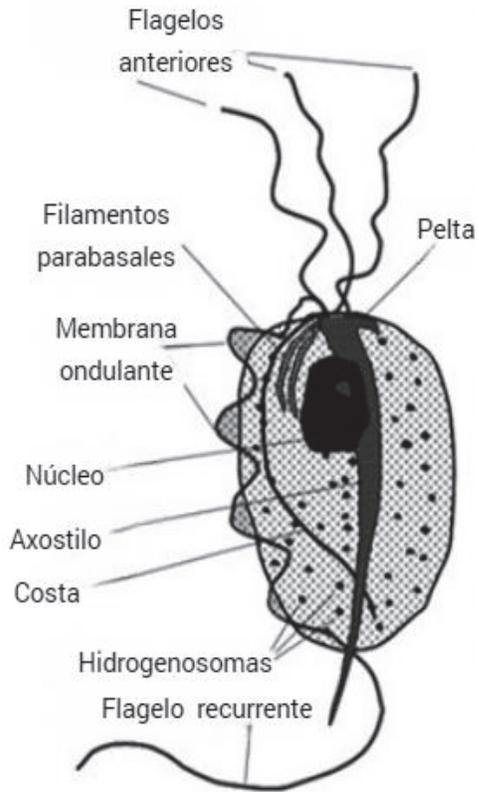
A**B**

Figura 1: Estructuras características de *Tritrichomonas foetus*. (A) Esquema de *T. foetus* donde se visualizan las principales estructuras: Flagelos anteriores, flagelo recurrente, filamentos parabasales, axostilo, costa, pelta, núcleo, hidrogenosomas, y membrana ondulante. Adaptado de Collántes-Fernández *et al.*, 2018. (B) Fotografía de una microscopía electrónica de barrido de *T. foetus*. FA: flagelos anteriores. FR: flagelo recurrente. MO: membrana ondulante.

Si bien no se conocen diferentes estadios a lo largo del ciclo de vida de *T. foetus*, se ha reportado que la plasticidad de su protoplasma le permite adoptar dos formas definidas: el “trofozoíto” piriforme que constituye la mayor parte de la población^{5 6 7}; y el “pseudoquiste” esferoidal e inmóvil con los flagelos invaginados, que se observa principalmente cuando los trofozoítos se encuentran en condiciones medioambientales desfavorables (temperatura hostil o deficiencias nutricionales)⁸. Dichas formas pseudoquísticas endoflageladas poseen además, la capacidad de revertir a la morfología de trofozoíto cuando se restablecen las condiciones externas óptimas para el protozoario¹⁰ (Fig. 2).



Figura 2: Representación gráfica del cambio morfológico de *T. foetus* dependiente de las condiciones externas (favorables y de estrés).

Tritrichomonosis bovina

La tritrichomonosis genital bovina es una enfermedad venérea que cursa con abortos e infertilidad; por lo cual genera importantes pérdidas económicas en la ganadería de diferentes regiones del mundo. Si bien dicha enfermedad presenta una distribución mundial, las regiones principalmente afectadas se encuentran en Asia, Australia, América del Sur y África. En este contexto, la prevalencia de *T. foetus* en Estados Unidos es de 30.4 %, en Australia de 65.6% y en España de 37%; finalmente en nuestro país, la prevalencia varía del 5% al 25% en los rodeos de cría ^{11 12 13}. Si bien se ha informado que la enfermedad se transmite principalmente mediante la cópula durante los servicios naturales; también existen casos informados de transmisión por inseminación artificial, al utilizar semen congelado contaminado con el parásito ^{1 14}. Cabe destacar que la tritrichomonosis tiene mayor incidencia en aquellas regiones donde predominan los sistemas de explotación ganadera de tipo “extensivo”; en los cuales las vacas y los toros comparten pasturas y se reproducen de manera natural ¹⁵. En aquellos países donde predominan los sistemas productivos de tipo “intensivos”, la incidencia de la enfermedad es baja debido a que el manejo reproductivo es controlado; lo que conlleva el uso de la inseminación artificial, el control sanitario del semen y el descarte de los animales infectados ¹.

En los machos bovinos el parásito *T. foetus* permanece de forma persistente y asintomática colonizando el epitelio del prepucio, pene y ocasionalmente el orificio uretral ^{1 16}. En los toros mayores de 4 - 5 años raramente ocurre la recuperación espontánea y estos animales

se convierten en una fuente permanente de infección para el rodeo ¹. En las vacas la principal sintomatología de la enfermedad es la inflamación de la vagina, del oviducto, del cuello uterino y del endometrio ^{1 15}; observándose descargas vulvo-vaginales mucoides ó mucopurulentas en algunas ocasiones. El impacto de esta parasitosis en las hembras se asocia a fallas reproductivas entre las que se destacan: múltiples cubriciones infértiles, ciclos estrales irregulares, muerte temprana del embrión y abortos ¹⁵.

Si bien la vía de transmisión venérea de esta parasitosis fue descrita hace aproximadamente 100 años; en el año 2023 nuestro grupo de trabajo publicó un estudio que revela la existencia de una ruta alternativa de contagio. Hemos evidenciado que *T. foetus* es capaz de sobrevivir al tránsito a través del tracto gastrointestinal del rumiante, que puede ser eliminado a través de las heces y de esta manera contaminar la entrada subyacente del aparato reproductor de la hembra (“autoinfección”). Además, demostramos que *T. foetus* puede sobrevivir en las heces bovinas y en el agua durante varios días, debido a la formación de estructuras de resistencia similares a quistes ¹⁷ **(Fig. 3)**. Los resultados obtenidos en dicho estudio nos llevaron a postular la existencia de un nuevo ciclo de vida **(Fig. 3)**.

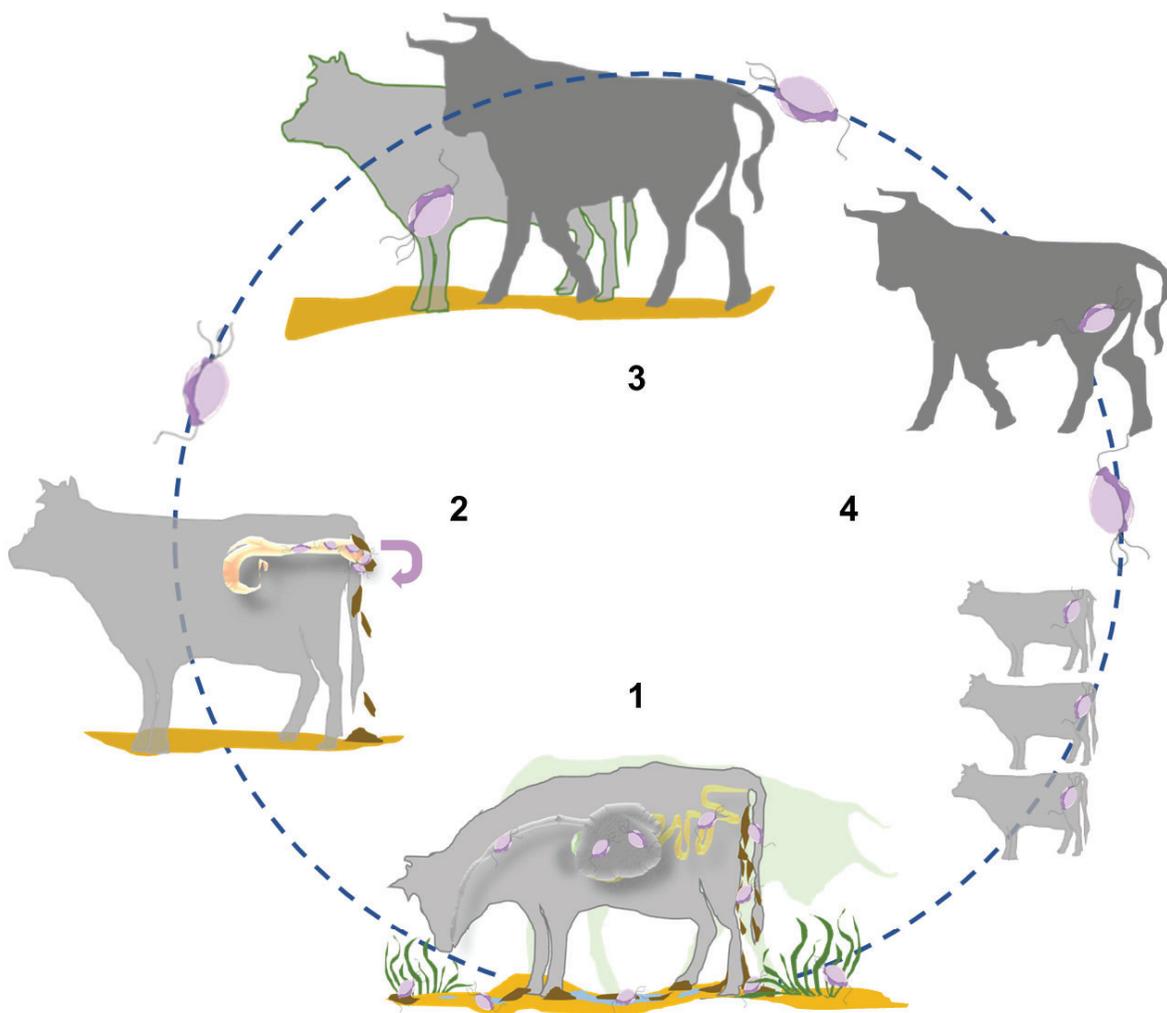


Figura 3: Ciclo de vida del parásito *Tritrichomonas foetus*. (1) Las heces del ganado conteniendo *T. foetus* contaminan el ambiente (específicamente el agua y las pasturas que pueden ser ingeridas por los animales). (2) Las heces conteniendo *T. foetus* pueden contaminar la vulva de la hembra durante la eyección. (3-4) El macho bovino se contagia durante el servicio y disemina la infección en el rodeo (ruta venérea).

Finalmente, si consideramos que la duración de la gestación bovina ronda los 282 días dependiendo de la raza; una disminución de la fertilidad se traduce en una disminución en el número de terneros obtenidos por año, lo que genera considerables pérdidas económicas anuales en un rodeo. En la Argentina, la enfermedad es considerada endémica ¹⁵ y la tritrichomonosis bovina es una de las principales responsables de las pérdidas anuales generadas por enfermedades venéreas en la pampa húmeda; donde dichas pérdidas

rondan los 1.8 millones de terneros, ó sea aproximadamente 280 millones de dólares. Cabe destacar que dicha cifra asciende a más de 300 millones de dólares anuales al sumar gastos de insumos veterinarios, pérdidas producidas por la venta de toros infectados y vacas vacías infértiles. En este contexto, resulta relevante el abordaje de estudios enfocados en la biología de este protozooario, sobre todo teniendo en cuenta que en la actualidad no existen herramientas diagnósticas, profilácticas y terapéuticas totalmente eficaces para el control de esta enfermedad en los rodeos bovinos.

Tritrichomonosis felina

En el año 2003 se reportó que *Tritrichomonas foetus* también es el agente causal de diarrea en los gatos domésticos ^{2 18}. La diarrea causada por *T. foetus* suele afectar a gatos jóvenes, con una media de edad de 8 meses y el 75% de los gatos afectados tienen menos de un año de edad. No obstante, los gatos de cualquier edad pueden ser portadores, y parte de ellos podrá desarrollar signos clínicos. En estos animales, los trofozoítos se transmiten por vía fecal-oral de un gato infectado a uno sano ¹⁹. Además, se comprobó que la parasitosis se propaga entre los felinos a través de la contaminación con heces del alimento y el agua que forman parte de la dieta ²⁰. El signo clínico predominante en estos animales es la diarrea crónica ó intermitente, reportada en aproximadamente el 61% al 64% de los gatos infectados ²¹. En estos animales la prevalencia reportada ronda el 10-59% y existen pocos datos sobre su prevalencia geográfica específica

Ciclo celular

El ciclo celular se divide generalmente en dos períodos distintos: la **interfase** o fase más larga que abarca la mayor parte de la vida de la célula; y la **mitosis** o fase más rápida en la cual las células se dividen.

La interfase, a su vez, se subdivide en tres etapas distintas y consecutivas: G1, S y G2 ²² (**Fig. 4**). En la fase G1, la célula presenta un metabolismo y crecimiento muy activos, y es en esta fase en donde se lleva a cabo la síntesis de moléculas y organelas necesarias para llevar adelante las diferentes funciones celulares. Durante esta etapa, las células, dependiendo de señales externas recibidas, pueden entrar en la fase G0 (fase no proliferativa) o continuar el ciclo y entrar en la fase S ²³. De esta manera, si el entorno es favorable, las células entran en la fase S, donde ocurre la replicación del ADN. En este punto, cada cromosoma se duplica, lo que permite que las futuras células hijas reciban el mismo contenido de ADN presente en la célula madre. Después de la replicación del ADN, la célula está casi lista para la división; y justo antes de la mitosis, las células atraviesan un período G2 en el que se sintetizan las moléculas necesarias para dicha división. Por lo tanto, al igual que G1, G2 es un período de crecimiento en el que las actividades celulares permiten que

la célula se divide. La mitosis ocurre en un corto período de tiempo en la vida de la célula y tiene como función principal la división nuclear y la distribución equitativa de las moléculas de ADN replicadas en la fase S, en cada célula hija.

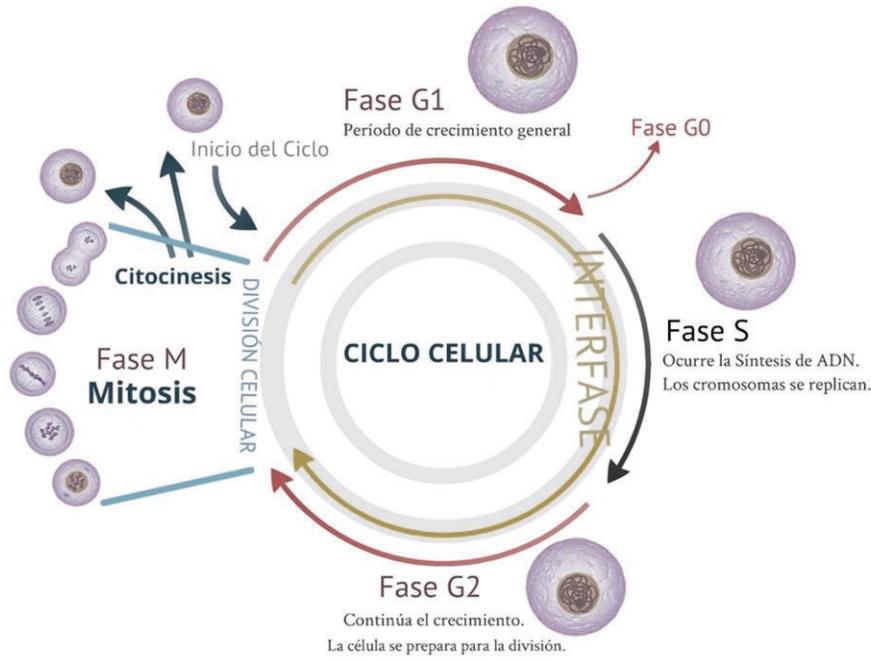


Figura 4: Representación esquemática de las fases del ciclo celular.

Formalmente, la mitosis se divide en cuatro etapas distintas: profase, metafase, anafase y telofase. Al final de estas fases secuenciales, tiene lugar la citocinesis o la individualización de las dos células hijas. Durante la profase, los cromosomas duplicados comienzan a condensarse, y este estado condensado del ADN es crítico para su correcta segregación. De hecho, los cromosomas más largos de la interfase serían muy difíciles de segregar de manera igual, y la citocinesis no ocurriría correctamente si fragmentos de ADN aún estuvieran en la región de la fisura de división. En una mitosis típica, durante la **profase**, además de la reorganización de la cromatina, ocurre el ciclo de duplicación del centrómero (el principal centro organizador de microtúbulos en las células animales). Así, cada uno de los centrómeros recién duplicados migra hacia los polos opuestos de la célula mientras el huso mitótico, que resulta de la reorganización de los microtúbulos de la interfase, comienza a ensamblarse. Al final de la profase, se puede observar la desintegración de la envoltura nuclear. Las cromátidas hermanas están conectadas en la región específica del centrómero, una región rica en heterocromatina donde se reclutan y ensamblan las proteínas del cinetocoro. De hecho, en esta estructura transitoria específica es donde se

conectarán los microtúbulos del huso. La **metafase** sigue a la profase y se caracteriza por la posición ecuatorial de los cromosomas mitóticos en la región media del huso, formando la placa metafásica. Dependiendo de si es una mitosis simétrica o asimétrica, el huso se posiciona en diferentes regiones del citoplasma. Las células se detienen en la metafase hasta que todos los cinetocoros estén conectados de manera estable a los microtúbulos del huso. Una vez que se cumple esta conexión, las células pueden pasar a la anafase. En este punto, las cromátidas hermanas de cada cromosoma se segregan hacia los polos opuestos de la célula. El huso mitótico se alarga y los centrómeros ahora están localizados en las regiones distales de la célula. Al final de la mitosis, después de la segregación de las cromátidas hermanas, tiene lugar la **telofase**. El ADN, distribuido de manera equitativa entre las células hijas, comienza a descondensarse y se ensamblan las nuevas envolturas nucleares. Simultáneamente, el citoplasma de la célula madre se divide en dos, en un proceso conocido como citocinesis ²⁴ (**Fig. 5**).

Si bien la descripción previa corresponde a un ciclo celular típico, existen organismos que presentan diferencias notables durante este proceso. Por ejemplo, el centrómero no está presente en todos los organismos, y, por lo tanto, existen estrategias alternativas para construir el huso mitótico. En el caso de *Saccharomyces cerevisiae*; estas células poseen una estructura homóloga al centrómero llamada cuerpo del polo del huso (SPBs) ²⁴. Otra diferencia notable es el caso de los organismos que presentan mitosis cerrada (criptomitosis) donde no ocurre la desintegración de la envoltura nuclear durante la interfase. Se reconoce que este tipo de mitosis es uno de los más antiguos en términos evolutivos ²⁵ y que se encuentra presente en organismos pertenecientes a los seis supergrupos de eucariotas.

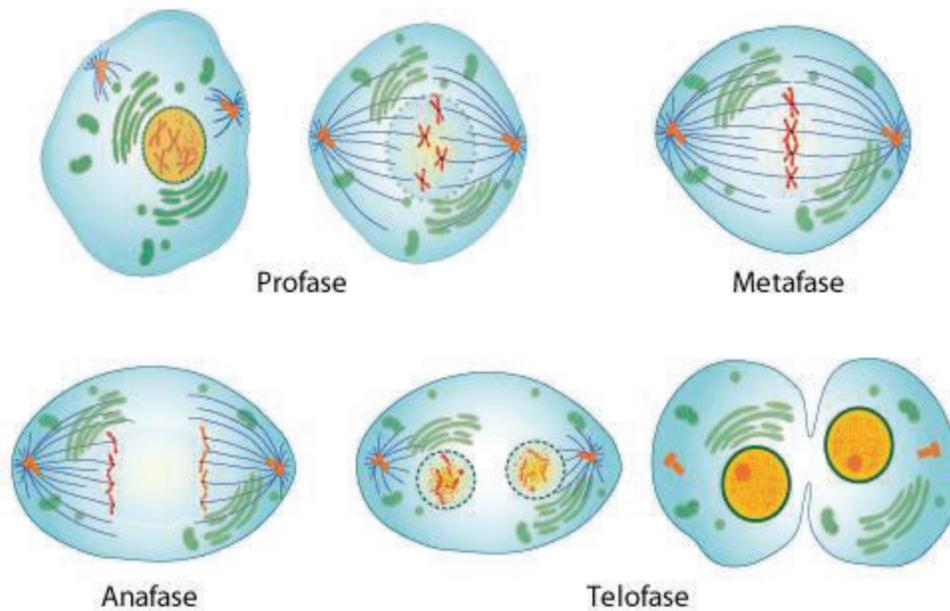


Figura 5: Representación esquemática de las fases de la mitosis. **Profase:** se ensambla el huso mitótico y la información genética duplicada se compacta y se condensa formando los cromosomas. Se desensambla la membrana nuclear. **Metafase:** los cromosomas se posicionan en el plano ecuatorial. **Anafase:** las cromátidas hermanas se dirigen hacia los polos opuestos del huso. **Telofase:** las cromátidas hermanas llegan a sus polos correspondientes. La envoltura nuclear se ensambla nuevamente.

En la naturaleza existen tres tipos de mitosis: **abierta**, en la cual la envoltura nuclear desaparece para que los husos mitóticos puedan interactuar con los cromosomas; la de tipo **semiabierta**, en la cual la envoltura nuclear permanece intacta pero los husos mitóticos la atraviesan para dividir los cromosomas; y finalmente la mitosis **cerrada**, en la cual la envoltura nuclear no desaparece y el huso mitótico es extranuclear ^{26 27}.

Específicamente, las mitosis cerradas se pueden subdividir en dos grupos principales según la disposición y la ubicación del aparato del huso: ortomitosis y pleuomitosis ²⁸. La ortomitosis tiene simetría axial (monaxonal) en la metafase; mientras que en la pleuomitosis, el huso es excéntrico y todo el aparato mitótico tiene simetría bilateral en las etapas intermedias de la mitosis ²⁹. Algunos organismos presentan un huso que permanece dentro del núcleo durante la división; mientras que, en otros, el huso se forma en el citoplasma ó extra nuclearmente.

Esta variación en la localización del huso mitótico es un rasgo distintivo de la pleuomitosis entre diferentes especies ²⁹. La pleuomitosis cerrada extranuclear ó criptopleuomitosis es típica de los tricomonadidos y de los hypermastigida ³⁰; y se caracteriza por conservar la integridad de la envoltura nuclear durante todo el proceso y el huso completo extranuclear (incluidos centros organizadores de microtúbulos ó MTOCs, el huso central y las fibras

cromosómicas). Solo los cromosomas permanecen dentro del envoltorio nuclear; y dichos cromosomas deben interactuar con los microtúbulos del huso a través de la envoltura nuclear intacta. Ésto se logra mediante la incorporación de los cinetocoros cromosómicos en la envoltura nuclear, de modo que sus superficies externas pueden capturar a los microtúbulos del citoplasma ²⁹ (Fig. 6).

		Pleuromitosis	Ortomitosis
Cerrada	Extranuclear		—
	Intranuclear		
Semiabierta			
Abierta		—	

Figura 6: Tipos de mitosis existentes en la naturaleza.

Finalmente es relevante mencionar que los organismos unicelulares regulan su ciclo celular de acuerdo con el entorno específico en el que viven. Por ejemplo, los unicelulares de vida libre pueden controlar su proliferación celular en relación con la abundancia de nutrientes y a los factores físicos, tales como la temperatura. En el caso de los parásitos unicelulares; la regulación del ciclo celular es un mecanismo fundamental de control de la supervivencia y de defensa frente al hospedador ^{31 32}.

Replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN)

El ciclo celular en las células eucariotas es un proceso altamente regulado y conservado. Si bien la progresión más frecuente del ciclo celular (conocido como el 'ciclo mitótico clásico') es la secuencia de las fases G1-S-G2-M, también se ha demostrado la existencia de variaciones y adaptaciones en diferentes tipos de células y organismos. Estos ciclos celulares alternativos pueden deberse a diversas razones: las necesidades específicas de un tipo celular, el entorno en el que se encuentra o las etapas de desarrollo del organismo; y resultan cruciales para mantener la homeostasis y la integridad celular en determinados contextos biológicos.

Una de las alternativas dentro de la progresión normal del ciclo celular son los ciclos de endoreplicación del ADN. En estos ciclos alternativos sucede la replicación del ADN durante la fase S sin la posterior finalización de la mitosis y/o citocinesis. El resultado de este tipo de replicación es la generación de células poliploides ó células con un contenido de ADN aumentado de forma controlada. El mayor contenido de ADN puede concentrarse en un núcleo (endociclo) o estar distribuido en varios núcleos (endomitosis) generando células multinucleadas ^{33 34 35} (Fig. 7).

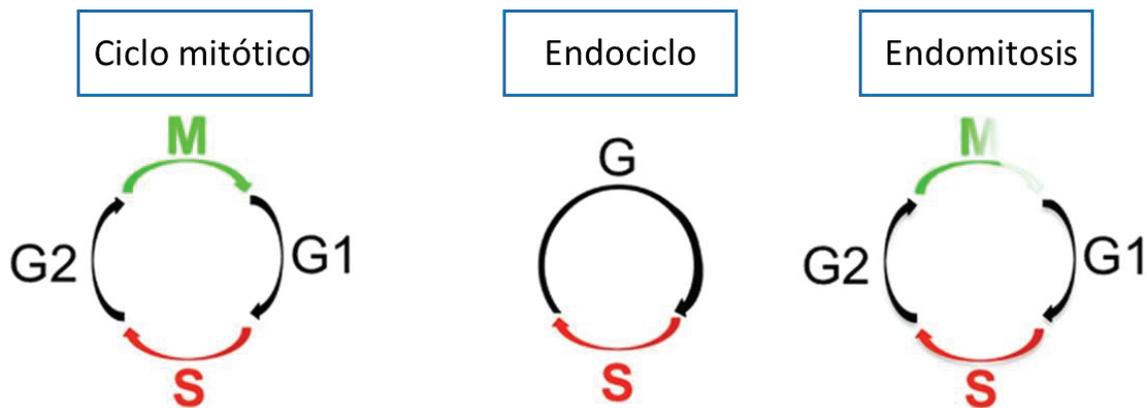


Figura 7: Representación gráfica del ciclo celular mitótico y de ciclos celulares alternativos (endociclo y endomitosis).

La endoreplicación del ADN resulta esencial para el desarrollo normal de diversos tipos celulares. Muchos organismos utilizan este proceso como parte de la diferenciación terminal, para aportar nutrientes y proteínas necesarias para respaldar el desarrollo del óvulo o embrión en desarrollo. Algunos de los ejemplos mejor estudiados incluyen el endospermo de las plantas, las células foliculares y las células nutricias de *Drosophila*, y el trofoblasto de los roedores ^{33 34 35}. En mamíferos, se observa la endoreplicación del ADN y la poliploidía en múltiples tejidos y órganos durante el desarrollo normal: la piel, la placenta,

el hígado y la sangre ³⁶. Por otro lado, los megacariocitos son un tipo celular especializado en producir plaquetas; y durante su programa de diferenciación aumenta su ploidia vía endomitosis hasta 128N ³⁷. Esto permite que luego por fragmentación pueda generar un número alto de plaquetas. En la placenta, las células gigantes del trofoblasto realizan endoreplicación del ADN para generar una barrera entre el suministro de sangre materna y la del embrión ³⁸. Los hepatocitos de mamíferos también experimentan poliploidización gradual mediante endomitosis durante el crecimiento postnatal, lo cual es un indicador de diferenciación terminal y senescencia. En insectos como *Drosophila melanogaster*, muchos tejidos larvales (incluyendo la glándula salival, cuerpo graso, intestino y tráquea) y tejidos adultos (incluyendo el epitelio folicular ovárico, células nutricias germinales, glía e intestino) experimentan poliploidía ³⁶. El desarrollo del epitelio folicular ovárico en estos organismos progresa a través de tres etapas continuas y distintas: mitótica, de endoreplicación y de amplificación génica del corion; para la producción suficiente de proteínas de la cáscara del huevo ^{39 40}. Por otra parte, en las glándulas salivales larvales la endoreplicación asegura la correcta síntesis de proteínas digestivas y sustancias de adhesión para su secreción y almacenamiento ⁴¹. La endoreplicación del ADN resulta más común en las células de las plantas que en las células de animales, y desempeña un rol crucial en el desarrollo vegetal, en el mantenimiento del genoma y las funciones celulares. Otro ejemplo destacado es el rol fundamental de la endoreplicación durante el desarrollo de las semillas en las plantas. Durante esta fase, las semillas dependen del endospermo como una fuente de energía hasta que completan su desarrollo y pueden obtenerla a través de las raíces y la fotosíntesis. El endospermo es un tejido que se somete al proceso de endoreplicación para cumplir con estas importantes funciones durante el desarrollo inicial de la planta ⁴². También este proceso puede desempeñar un rol crucial en la adaptación de las plantas a condiciones adversas, tales como la salinidad, la sequía o cambios extremos de temperatura ⁴³.

Los endociclos se definen como ciclos celulares que consisten en las fases S y G sin división celular. Las células en endociclo no ingresan en la mitosis y, por lo tanto, no exhiben características de la mitosis como la condensación de los cromosomas y la ruptura de la envoltura nuclear cuando es parte del proceso. Por su parte, en la endomitosis el genoma se replica, se inicia la mitosis, pero no se completa; lo que resulta en una célula poliploide mononucleada o multinucleada.

Las células con múltiples núcleos se han descrito en plantas, hongos y protozoos; y se han asociado con posibles ventajas funcionales, especialmente cuando dichos organismos se encuentran en condiciones ambientales adversas. En Amoebozoa, la multinuclearidad se encuentra en muchas especies (*Entamoeba histolytica*, *Naegleria gruberi* y *Hartmannella rhyodes*); y a pesar de ser una característica integral de su ciclo de vida, existe una falta de evidencia sobre las funciones potencialmente asociadas a ella ^{44 45 46}. Por otro lado, se ha informado que los núcleos de *Plasmodium falciparum* se dividen de manera asincrónica durante algunas etapas de la infección, formando células multinucleadas antes de egresar de la célula hospedadora ⁴⁷. Específicamente, en los trichomonadidos (*Trichomonas*

vaginalis, *Trichomonas augusta*, *Trichomonas lacerate*, *Trichomonas muris*, *Eutrichomonas serpentis* y *Tetratrichomonas prowazeki*, existe poca información sobre la ocurrencia de formas multinucleadas ⁴⁸. En *Tritrichomonas foetus*, hasta la fecha, las células multinucleadas se han relacionado exclusivamente con estructuras pseudoquisticas ^{49 50}, que son aquellas estructuras que se forman en condiciones ambientales desfavorables y que pueden revertir a trofozoítos al restablecerse las condiciones externas óptimas ¹⁰.

División celular de *Tritrichomonas foetus*

Desde los organismos unicelulares más simples hasta los eucariotas superiores, la célula es el elemento básico cuya función principal es mantener la información genética específica y transmitirla a las generaciones futuras. En el caso de los organismos multicelulares, el adulto surge de un período de desarrollo más o menos extendido en el que una célula original única ó cigoto, origina varios tejidos y órganos especializados a través de múltiples divisiones celulares. Después de finalizar este proceso de desarrollo, la división celular permite, en el adulto, la renovación celular y, por lo tanto, el mantenimiento de la homeostasis del organismo.

En este contexto, se ha descrito mediante cariotipado que *T. foetus* conserva su material genético distribuido en 5 cromosomas ⁵¹ y que se reproduce de forma asexual, específicamente mediante fisión binaria longitudinal, para dar origen a dos células hijas idénticas ^{51 52}. En *T. foetus* se ha reportado que durante la fase G1 del ciclo celular, antes del inicio de la mitosis, se duplican todas las estructuras citoesqueléticas y las organelas asociadas ⁵²; los cinco cromosomas comienzan a condensarse (permaneciendo condensados hasta el final de la mitosis). La mitosis comienza cuando los cuerpos basales (cinetosomas) inician su migración, lo que provoca el desplazamiento de los flagelos y los axostilos, dando lugar a un cambio en la morfología celular ⁵¹. Cerca de los cinetosomas se encuentran los atractoforos (MTOCs ó centro organizador de microtúbulos), que son estructuras que sirven de anclaje para los cromosomas. A medida que avanza la mitosis el núcleo comienza a elongarse acompañado por el axostilo, el cual facilitará posteriormente la cariocinesis. Finalmente, durante la citocinesis, las dos células hijas culminan la separación citosólica mediante la propulsión generada por los flagelos ^{51 7}.

OBJETIVOS

Objetivo general

La división celular es un proceso fundamental para el crecimiento, desarrollo, reparación y mantenimiento de los organismos vivos. Si bien se ha reportado que *Tritrichomonas foetus* se divide mediante fisión binaria longitudinal, es escaso el conocimiento existente acerca de la regulación de la división celular de este protozooario. En este contexto, nos propusimos en este trabajo de tesis caracterizar a nivel celular y molecular la división celular del parásito *T. foetus*. Para abordar este objetivo general planteamos dos objetivos específicos; los cuales serán desarrollados en dos capítulos independientes pero complementarios.

- 1. Caracterizar el proceso de división celular en el parásito *T. foetus*:** *T. foetus* se divide mediante fisión binaria longitudinal, generando dos células hijas a partir de una célula madre. Sin embargo, en el trabajo diario en el laboratorio observamos incompatibilidades con este mecanismo de división propuesto para el parásito. Dadas estas observaciones y la escasez general de información sobre este proceso en trichomonadidos, nos planteamos analizar detalladamente el mecanismo de división celular en el parásito *T. foetus*.
- 2. Establecer el rol de la proteína MOB1 en el proceso de división celular de *Tritrichomonas foetus*:** Las vías "Hippo" son sistemas de señalización conservados evolutivamente, que controlan la proliferación celular y la morfogénesis en otros tipos celulares. MOB1 es una proteína de la vía Hippo y es clave para la salida de la mitosis; siendo relevante para la correcta transición de la metafase a la anafase; así como también para el equilibrio entre la proliferación y la muerte celular. En este contexto, nos propusimos evaluar el rol de la proteína TFMOB1 en el ciclo celular de este protozooario.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos de parásitos

Cepas de *T. foetus*: K (Embrapa, Río de Janeiro, Brasil) ⁵³, cepas OLI, 97H, V47 y 62H (Argentina); y cepas de *T. vaginalis* con diferentes niveles de adherencia a células hospedadoras: G3 y RU384 (baja), B7268 y CDC1132 ó MSA1132 (alta) ⁵⁴. Las cepas de *T. foetus* y *T. vaginalis* se incubaron en medio *Diamond's Trypticase-yeast extract-maltose* (TYM) suplementado con un 10% de suero de caballo y 10 U/mL de penicilina/10 mg/mL de estreptomina (Invitrogen). Los parásitos se mantuvieron a 37°C y se pasaron diariamente. El constructo TvTSP6-HA se generó y se transfectó en la cepa *T. vaginalis* CDC1132 como se describió previamente ⁵⁵.

Ensayo de crecimiento de parásitos

Las curvas de crecimiento cinético se realizaron utilizando las cepas de *T. foetus* K, OLI, 97H y V47, así como las cepas de *T. vaginalis* G3 y B7268. Para estos experimentos, se inocularon 1×10^5 trofozoítos en 8 mL de medio TYM y se incubaron a 37°C durante 72 horas. Después de la inoculación, se registraron los recuentos celulares en los siguientes momentos: 20, 25, 43, 48 y 67 horas utilizando una cámara de Neubauer. Las tasas de crecimiento se determinaron teniendo en cuenta el logaritmo natural del cambio en la densidad de parásitos por mililitro en el tiempo t en comparación con el tiempo cero (inóculo inicial) mediante la siguiente ecuación: tasa de crecimiento = $[\ln CC(t) - \ln CC(0)] / (t - 0)$, donde CC(t) y CC(0) son los recuentos de parásitos por mililitro en el tiempo t y en el tiempo cero, respectivamente, y t es el tiempo de incubación ⁵⁶. Los experimentos se realizaron tres veces y por triplicado.

Tinción de núcleos de *T. foetus*

El número de núcleos por célula se determinó utilizando la tinción con DAPI (49, 6-diamidino-2-fenilindol). Los parásitos en ausencia de células hospedadoras fueron incubados a 37°C sobre cubreobjetos de vidrio durante 4 horas, luego fueron fijados y permeabilizados en metanol frío durante 10 minutos. Las células fueron lavadas tres veces con PBS (Solución salina taponada con fosfato) y se incubaron con una solución de tinción de DAPI de 300 nM durante 5 minutos, protegidos de la luz. Después de 3 lavados con PBS, los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos de vidrio utilizando un medio de montaje ó fluoromount. Los núcleos de los parásitos fueron teñidos con DAPI para el análisis del tamaño nuclear. El área nuclear en μm^2 fue examinada utilizando la herramienta de umbral de Image J y la función "*Analyze Particles*". Los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron tres veces.

Ensayo de inmunolocalización

Los parásitos, cultivados en diferentes condiciones, se incubaron a 37°C sobre cubreobjetos de vidrio durante 4 horas, luego se fijaron y permeabilizaron en metanol frío durante 10 minutos. Las células fueron lavadas con PBS y luego bloqueadas con suero fetal bovino (SFB) al 5% en PBS durante 30 min. Luego dichos parásitos se incubaron durante la noche con el anticuerpo primario diluido en PBS más SFB al 2%. Los anticuerpos primarios utilizados en los diferentes experimentos de inmunolocalización fueron anti-HA (1:500) (Covance), anti- α tubulina (1:500), anti-BrdU (1:300), anticuerpo monoclonal anti-PCNA (Abcam) (1:400) y anti-MOB endógena desarrollado en conejo por Citterio y colaboradores ⁵⁷. Los cubreobjetos se lavaron con PBS y luego se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con una dilución de 1:5000 del anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488 ó Alexa Fluor 594 dependiendo el ensayo). Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos de vidrio utilizando el reactivo ProLong Gold con DAPI o 49,69-diamidino-2-fenilindol (Invitrogen). Todas las observaciones se realizaron en un Zeiss Axio Microscopio de fluorescencia invertida Observer 7 (Zeiss). Para el procesamiento de imágenes se utilizó el programa Adobe Photoshop (Adobe Sistemas).

Inmuno-electromicroscopía de transmisión

Las muestras se fijaron con una solución compuesta por paraformaldehído (PAF) 4%, glutaraldehído 0.5% en tampón cacodilato 0,1 M (pH 7,2) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, se realizaron lavados con la solución PBS y se incubaron con anticuerpos anti-MOB (1:1000) y posteriormente con partículas de oro de un tamaño de 10 nm conjugadas a un anticuerpo secundario anti-conejo. Las muestras se lavaron, se secaron y se observaron con un microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai G2 Spirit operando a 120 kV. Las imágenes se adquirieron de manera aleatoria con un sistema de cámara CCD (MegaView G2, Olympus, Alemania). Como control negativo se utilizaron las partículas de oro conjugadas con el anticuerpo secundario anti-conejo.

Tinción con Calcofluor white

Los parásitos fueron pipeteados sobre un portaobjetos de vidrio, secados al aire y fijados en metanol durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos fueron lavados tres veces en PBS durante 5 minutos cada vez, e incubados con un 0,01% de Calcofluor white (Sigma) en PBS (pH 7,2) durante 30 minutos a 26°C. Luego, los portaobjetos fueron lavados tres veces en PBS, montados con fluoromount G y observados con un microscopio de

contraste de fase y fluorescencia (microscopio de fluorescencia invertido Zeiss Axio Observer 7).

Citometría de flujo

Para determinar el contenido de ADN y el tamaño celular, los parásitos (5×10^6) fueron recolectados y fijados en 5 mL de etanol al 100% a una temperatura de 4°C durante toda la noche. Posteriormente, cada muestra fue lavada con 1 mL de PBS que contenía un 2% en vol/vol de suero equino (SE), luego fue resuspendida en 1 mL de PBS con 180 mg/mL de RNasa A (para digerir el ARN) y un 2% en vol/vol de SE, e incubada durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, las muestras fueron teñidas con una solución de yoduro de propidio (IP) a una concentración de 25 mg/mL, e incubadas durante 30 minutos a 37°C antes del análisis con el citómetro de flujo. Dicho análisis se llevó a cabo utilizando un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton, Dickinson) equipado con un sistema de láser dual (láser de argón de 15 mW a 488 nm y un láser de diodo rojo de 635 nm). Para la medición del contenido de ADN, las células fueron excitadas con luz de 480 nm, y la emisión se midió a través de 585/42 (para la fluorescencia de IP; FL2). Se registraron datos de 20.000 células, y estos datos conjuntos se analizaron utilizando el software FlowJo 7.6. La correlación entre las propiedades de dispersión de luz de las células y su contenido de ADN se realizó estableciendo gate electrónicas en los perfiles de dispersión hacia adelante (FSC) y dispersión lateral (SSC), y verificando el contenido de ADN de cada gate.

Depleción y privación de nutrientes

Para la depleción de nutrientes, los parásitos *T. foetus* (cepas K y 62H) se sincronizaron mediante privación de suero durante 12 horas, aumentando de esta manera la abundancia de parásitos mononucleados en los medios de cultivo. Luego, dichos parásitos se incubaron en presencia de suero (sin cambio de medio de cultivo), y se tomaron muestras cada 12 horas hasta su fase de muerte. Las muestras se fijaron, los núcleos se tiñeron con DAPI y luego se cuantificaron mediante microscopía de fluorescencia. Para evaluar el contenido de ADN en cantidades bajas o depleción de nutrientes, se analizaron las cepas *T. foetus* K y 62H en las siguientes condiciones de cultivo: parásitos control (control), los cuales fueron incubados por 24 horas en medio de cultivo estándar en presencia de suero; parásitos sincronizados (sincro), los cuales fueron incubados por 12 horas en medio de cultivo estándar sin suero; parásitos cultivados durante 36 horas en medio de cultivo estándar en presencia de suero (estrés leve), y parásitos incubados en medio de cultivo estándar en ausencia de suero durante 36 horas (estrés moderado). El contenido de ADN se determinó mediante citometría de flujo.

Para el ensayo de deprivación de nutrientes (estrés severo), los parásitos se incubaron en agua durante 24 y 48 horas a 37°C. Posteriormente, estas muestras se fijaron, los núcleos

se tiñeron con DAPI y se cuantificaron mediante microscopía de fluorescencia. El contenido de ADN se determinó mediante citometría de flujo.

Análisis del egreso de parásitos multinucleados

Para evaluar el egreso de trofozoítos a partir de los parásitos multinucleados inducidos por la depleción de nutrientes, los parásitos se incubaron tanto en medio de cultivo completo como en medio libre de suero durante 36 horas. Luego se recuperaron en un medio fresco en presencia de suero, se contaron en una cámara de Neubauer cuatro horas después del cambio de medio, y se calcularon las tasas de crecimiento.

Para analizar si la formación de estructuras esféricas durante la privación de nutrientes era un proceso reversible, los parásitos mantenidos durante 24 horas en agua fueron centrifugados e incubados en un medio de cultivo estándar durante 24, 48 y 72 horas a 37°C. Los parásitos se contaron en cámara de Neubauer y se calcularon los porcentajes de parásitos esféricos y trofozoítos en cada tiempo.

Incorporación de BrdU (5-bromo-2-desoxiuridina)

T. foetus previamente sometidos a privación de suero (12 horas) fueron incubados con BrdU (nucleótido sintético análogo a la timidina) durante 2 horas. Posteriormente, los parásitos se fijaron durante 15 minutos con paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente. Luego las células se lavaron con PBS y se incubaron con HCl 2 M durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió borato de sodio 0,1 M (pH 8,5) durante 2 minutos a temperatura ambiente. Los parásitos se lavaron con PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,2% y Albúmina Sérica Bovina (BSA) al 3% en PBS durante 5 minutos. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS/BSA durante 10 minutos cada uno y se incubaron con anticuerpos anti-BrdU diluidos en PBS/2% SFB. Luego, se realizaron tres lavados con PBS y se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario Alexa fluor 488. Finalmente, se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS y se añadió DAPI para teñir el ADN de los núcleos de los parásitos.

Tratamiento con colchicina

Los parásitos se incubaron en medio TYM con colchicina (1,5 mM) (Sigma) disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma). Las células se mantuvieron con el fármaco durante 18 horas a 37°C. Se realizaron experimentos de control utilizando trofozoítos cultivados con un 1% de DMSO. Posteriormente, se determinó el contenido relativo de ADN celular. Los parásitos se fijaron en 5 mL de etanol al 100% a temperatura fría, y se incubaron a 4°C durante la noche. Luego, cada muestra se lavó en 1 mL de PBS con un 2% en vol/vol de suero de equino (SE), se resuspendió en 1 mL de PBS, 180 g/mL de Ribonucleasa A (RNasa

A) y un 2% en vol/vol de SE, y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Luego, las muestras se tiñeron con una solución de yoduro de propidio (IP) a una concentración de 25 mg/mL, y fueron incubadas durante 30 minutos a 37°C antes del análisis mediante el citómetro de flujo. Además, los núcleos se tiñeron con DAPI y se observaron mediante microscopía de fluorescencia.

Clonado en vector de expresión de *Trichomonas*

El marco abierto de lectura completo de TfMOB1 fue clonado en el vector de expresión pMasterNeo-(HA)₂⁵⁸ mediante le agregado del sitio de corte de la enzima *NdeI* en el 5' del oligonucleótido sentido y un sitio de corte de la enzima *KpnI* en el 5' del oligonucleótido antisentido, ambos presentes en el sitio de clonado del vector. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados fueron:

Cebador sentido: AAACATATGATGATGCGTTCGCATAATAGTG

Cebador antisentido: AAAGGTACCAGATTTTATTTCAAAGATTTGATAATTG

Para el clonado de la proteína TfMOB1 truncada:

Cebador sentido: AAACATATGGGCGCTGGAAATTTTCGA

Cada gen se amplificó por PCR, se digirió con las enzimas *NdeI* y *KpnI*, (Promega) y se clonó directamente en el vector pMasterNeo-(HA)₂, el cual contiene el gen de neomicinafosfotransferasa (Neo) que permite su selección con el antibiótico Geneticina (G418). Además, el vector permite la expresión del gen fusionado a una etiqueta de HA en su porción C-terminal bajo el control de un promotor fuerte (α -SCS)⁵⁸. El producto amplificado se ligó durante toda la noche a 4°C con 50 ng de vector previamente digerido y defosforilado utilizando 1 μ l de Ligasa (Promega) y 1 μ l de Buffer Ligasa (Promega). Posteriormente se transformaron bacterias competentes Omnimax y las colonias que contenían el plásmido con el fragmento de interés fueron chequeadas mediante digestión con las enzimas *NdeI* y *KpnI*, y confirmadas mediante secuenciación (Macrogen, Corea).

Transfección de parásitos

La introducción de fragmentos de ADN dentro de una célula eucariota que inducen un cambio en la expresión génica se denomina "transfección". Uno de los métodos físicos utilizados para transfectar es la electroporación (basado en la introducción de las moléculas al interior de la célula mediante la emisión de pulsos eléctricos). Mediante esta metodología transfectamos parásitos *T. foetus* de la cepa K con los siguientes plásmidos: "pMasterNeo-TfMOBFL-HA", "pMasterNeo-TfMOB Δ Nt" y también con el plásmido "pMasterNeo vacío ó EpNeo" como control.

Para la transfección 300 μ l de medio TYM conteniendo aproximadamente $2,5 \times 10^8$ células se colocaron en una cubeta de electroporación de 0,4 cm (BioRad), a la cual se le agregaron 30 μ g de ADN plasmídico. Para la electroporación se utilizaron los siguientes parámetros en el electroporador: 450 volts y 960 mFd de capacitancia. Luego de la electroporación los parásitos se resuspendieron en tubos estériles con 50 ml de medio TYM complementado con suero fetal equino, y se incubaron por 4 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo se les agregó 100 μ l de G418 (Geneticina, Sigma) a una concentración de 100 mg/ml. Este antibiótico permitió seleccionar los parásitos positivos para la transfección, ya que el vector pMasterNeo posee un gen de resistencia a geneticina; por ende, solo crecerán en presencia de este antibiótico aquellos parásitos eficientemente transfectados. Luego de incubar los parásitos toda la noche se tomaron 40 ml de cada tubo falcon (evitando los parásitos muertos de los precipitados presentes en el fondo de los tubos) y se los transfirió a tubos estériles. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos, se descartaron los sobrenadantes y los *pellets* se resuspendieron en 50 ml de medio TYM complementado con suero fetal equino y con G418 a una concentración final de 200 mg/ml.

SDS-PAGE y Western blot

Los extractos proteicos totales de parásitos fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) 12% y fueron electrotransferidas en membranas de PVDF (GE Healthcare, Life Science). Las membranas fueron bloqueadas en leche en polvo al 5% (p/v) en solución tampón Tris con detergente Tween 20% (TBS-T) al 0,05% (v/v) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, fueron incubadas toda la noche a 4° C con los diferentes anticuerpos primarios (anti-MOB1: dilución 1/500, anti-HA: dilución 1/500). Terminada la incubación, las membranas se lavaron 3 veces con solución tampón TBS-T y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con un anticuerpo secundario anti-conejo ó anti-ratón conjugados con fosfatasa alcalina para poder luego ser visualizado utilizando el sistema NBT/BCIP (Roche).

PCR en tiempo real

Se utilizó el RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare Life Sciences) para extraer el ARN total de parásitos *T. foetus* de la cepa K, incubados en distintas condiciones de aporte de nutrientes. El ARN fue tratado con Dnasa I (Invitrogen) y posteriormente se realizó la transcripción inversa usando la transcriptasa reversa SuperScript II y hexámeros de oligonucleótidos al azar como cebadores (Invitrogen). Para las PCR en tiempo real se realizaron mezclas conteniendo SYBR Green qPCR Master Mix (Roche), 150-450 nM de cebador y 200-500 ng de ADN complementario en un volumen de reacción final de 15 μ l, las cuales se midieron con el sistema Stratagene Mx3005PTM (Agilent Technologies). Los

datos de las diferentes muestras fueron analizados utilizando el software LinRegPCR. Como gen normalizador se utilizó alfa-tubulina (Invitrogen). Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para RT-qPCR fueron:

TfMOB1:

Cebador sentido: TGGAAAAGATACCCCTCGGCG

Cebador antisentido: TATTGGTACTGTGGGCCTGC

Tubulina:

Cebador sentido: TCCGTGGCCGTATGTCATCT

Cebador antisentido: GCTGTTGTGTTGCCGATGAA

Obtención de ARN total para secuenciamiento de transcriptos (RNA seq)

Para llevar adelante la secuenciación del ARN (RNAseq), el ARN de los parásitos *T. foetus* (cepa K) se extrajo con el kit: RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare Life Sciences). Se obtuvieron tres muestras de ARN de parásitos incubados durante 48 horas en medio de cultivo sin suero. Como control se utilizó el ARN proveniente de parásitos crecidos en medio de cultivo estándar con suero. Luego el ARN fue tratado con Dnasa I para su posterior amplificación (Invitrogen). La preparación de la biblioteca y el secuenciamiento fueron realizados por Quick Biology. Las muestras fueron secuenciadas utilizando secuenciadores Illumina. Las lecturas fueron demultiplexadas utilizando Illumina bcl2fastq2 v2.20 con la configuración predeterminada. La calidad de las lecturas se evaluó utilizando FastQC. Se generaron aproximadamente 20 millones de lecturas.

Análisis de la expresión diferencial de genes

Se realizó un control de calidad de lecturas para cada biblioteca de Illumina empleando la herramienta FASTQC (*A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data* [Online]: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). La limpieza de adaptadores y filtrado de lecturas de baja calidad (largo menor a 35 nucleótidos y calidad mayor a phread 30) empleando el software TrimmGalore (<https://github.com/FelixKrueger/TrimmGalore>). Aquellas lecturas que superaron el filtro anterior fueron alineadas contra el genoma de referencia K1 de *T. foetus* (ASM183968v1) empleando la herramienta HISAT2⁵⁹. La cuantificación de los transcriptomas se realizó siguiendo el protocolo StringTie⁵⁹, pero empleando el paso alternativo para la obtención de la matriz de cuantificación cruda (script: prepDE.py). La matriz de cuantificación cruda de los genes de *T. foetus* fue empleada

como input para el paquete de R DEseq2 ⁵⁹ el cual fue empleado para realizar el análisis diferencial de genes (p -ajustado < 0.05 y $\log_2fc \geq 2$).

RESULTADOS DEL CAPÍTULO 1

***T. foetus* presenta un número variable de núcleos en condiciones estándar de cultivo**

La división celular de los parásitos *Trichomonas vaginalis* y *Tritrichomonas foetus* se da fundamentalmente por fisión binaria longitudinal; proceso mediante el cual una célula madre se divide en 2 células hijas idénticas y mononucleadas ^{7 52}. Sin embargo, en condiciones óptimas de cultivo *in vitro* es habitual encontrar parásitos *T. foetus* (cepa K) con múltiples núcleos; lo cual no sería esperable en microorganismos que se dividen por fisión binaria (**Fig. 8A**). Basándonos en estas observaciones, para evaluar si la existencia de parásitos multinucleados era un fenómeno general de las distintas cepas del parásito, evaluamos el número de núcleos por parásito en diferentes cepas de *T. foetus*, mediante la tinción con DAPI. Para realizar un ensayo más extensivo, se incluyeron también algunas cepas de *T. vaginalis* en este análisis. Parásitos en fase de crecimiento logarítmico fueron observados mediante microscopía de fluorescencia y pudimos comprobar que las distintas cepas de *T. foetus* presentaron una mayor heterogeneidad en el número de núcleos por célula, en comparación con las cepas de *T. vaginalis* (**Fig. 8B**). En particular, la cepa K de *T. foetus* presentaba la mayor variación en el número de núcleos por parásito; con un 34% de las células que contenían 2 núcleos y un 35% de los parásitos que contenían más de 2 núcleos. Además, en los aislamientos *T. foetus* 97H y 62H observamos un 36,6 y 29,4 % de parásitos con 2 ó más de 2 núcleos, respectivamente (**Fig. 8B**). Para evaluar si la cantidad de núcleos que poseen las distintas cepas tenía un efecto en el crecimiento de *T. foetus*, evaluamos las tasas de crecimiento de las distintas cepas estudiadas. Nuestros resultados indican que las cepas K y 97H presentaron un crecimiento significativamente menor cuando se calcularon las tasas de crecimiento (**Fig. 8C**). Estos resultados podrían sugerir que el número de núcleos no estaría relacionado con una mayor eficiencia en la multiplicación de estos parásitos incubados en condiciones estándar de cultivo.

A continuación, quisimos evaluar si existía heterogeneidad en el tamaño de los núcleos entre las distintas cepas. Pudimos observar que los núcleos presentaban tamaños variables (**Fig. 9A**), siendo la cepa 97H la que presenta núcleos más pequeños (promedio de $8,99 \mu\text{m}^2$) y la cepa V47 la que posee núcleos más grandes (promedio $12,58 \mu\text{m}^2$). En las cepas de *T. vaginalis*, los tamaños de los núcleos variaron entre $13,56 \mu\text{m}^2$ (cepa B7268) y $16,56 \mu\text{m}^2$ (cepa RU384). Basándonos en las diferencias observadas en el tamaño de los núcleos, posteriormente evaluamos si las distintas cepas de *T. foetus* y *T. vaginalis* presentaban

variación en el contenido de ADN. Para esto, los parásitos fueron fijados, marcamos el ADN con yoduro de propidio (IP) y finalmente lo cuantificamos mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos indican que el contenido de ADN en las distintas cepas de *T. foetus* era heterogéneo. La cepa TfOLI mostró un 90,19%, un 9,55% y un 0,25% de células con contenido de ADN nuclear de 1C, 2C y >2C, respectivamente. En los parásitos TfK, observamos que el 63%, el 26,13% y el 10,95% de las células mostraron contenido de ADN nuclear de 1C, 2C y >2C, respectivamente. TfV47 presentó un 42% de células con contenido de ADN 2C. Esta diferencia observada en el aislamiento Tf47 entre el número de núcleos por células y el contenido de ADN podría deberse a la presencia de parásitos con 1 ó 2 núcleos con un contenido de ADN superior a 1C. Por otro lado, *T. vaginalis* mostró una mayor homogeneidad en el contenido de ADN; en las cepas B7268 y G3, la mayoría de los parásitos (90%) presentaron un contenido de ADN nuclear de 1C (**Fig. 9B**).

Teniendo en cuenta que la poliploidía se ha asociado con un mayor tamaño celular en bacterias, plantas y en mamíferos^{60 61 62}; evaluamos el tamaño celular de las cepas de *T. foetus* y *T. vaginalis* mediante citometría de flujo. En la **Figura 9C**, mostramos que, a pesar de la heterogeneidad del ADN observada en algunos casos, las diferentes cepas de *T. foetus* y *T. vaginalis* no mostraron variación en su tamaño celular.

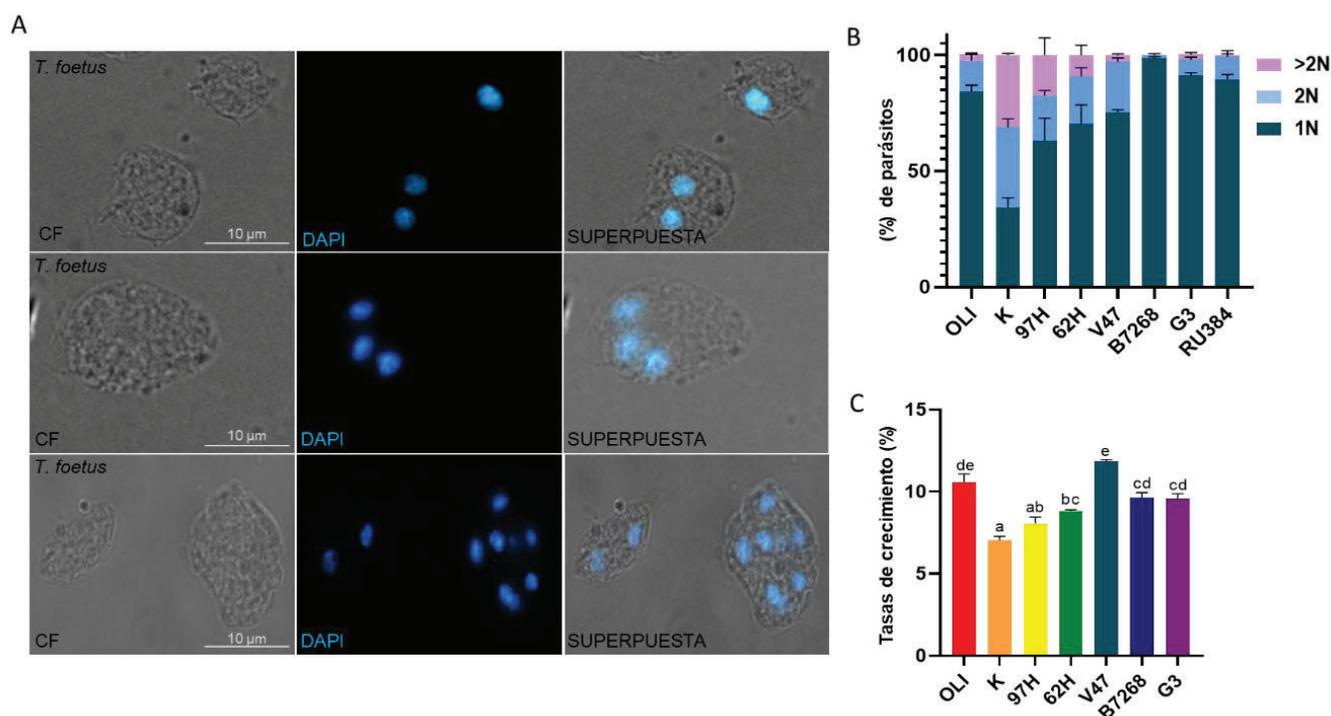


Figura 8: Heterogeneidad del número de núcleos de *T. foetus* y *T. vaginalis* en condiciones estándar de cultivo. (A) Imágenes representativas de parásitos de *T. foetus* con 1, 2 ó más de 2 núcleos por célula. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). CF, contraste de fase. Escala, 10 μ m. **(B)** Cuantificación del número de núcleos por parásito. Se cuantificaron cien parásitos de cada población por triplicado en 3 experimentos independientes. Se muestran los porcentajes de

parásitos con 1, 2 ó más de 2 núcleos. Se analizaron diferentes aislamientos de *T. foetus* (OLI, K, 97H, V47 y 62H) y cepas de *T. vaginalis* (B7268, G3, RU384 y CDC1132). Los resultados representan el promedio de 3 experimentos independientes y el error estándar (SE). **(C)** Tasas de crecimiento de aislamientos de *T. foetus* (OLI, K, 97H, 62H y V47) y cepas de *T. vaginalis* (B7268 y G3). Las barras representan el promedio de 3 experimentos independientes, y las barras de error representan la desviación estándar. Las diferencias entre las medias se establecieron utilizando la prueba de Tukey con un $\alpha = 0,05$. Las tasas de crecimiento se calcularon a partir de la concentración de parásitos en la fase estacionaria y el tiempo que tardan en alcanzar esa fase.

Investigaciones previas habían demostrado que los trofozoítos de *T. foetus* (células polares y flageladas) eran capaces de adoptar una forma esférica con flagelos internalizados en condiciones ambientales desfavorables; y a dichas formas se las denominó "pseudoquistes", por no presentar una pared quística verdadera⁶³. Esta forma pseudoquística presenta la particularidad de llevar a cabo divisiones nucleares y formar células multinucleadas^{63 10}. Basándonos en estos antecedentes, evaluamos si la presencia de células multinucleadas observadas en las distintas cepas de *T. foetus* en condiciones de cultivo estándar podrían deberse a la presencia de pseudoquistes. Para esto, evaluamos la presencia de flagelos externos ó internos en las células multinucleadas. Los resultados obtenidos indican que las células multinucleadas de *T. foetus* encontradas en condiciones de cultivo estándar, presentaban mayoritariamente los flagelos externos **(Fig. 9D)**, sugiriendo que dichas estructuras no serían pseudoquistes. Para corroborar esto, parásitos *T. foetus* crecidos en fase logarítmica de crecimiento fueron fijados y marcados con Calcofluor white (CFW); el cual es un fluorocromo no específico que se une a la superficie de los pseudoquistes/quistes⁶⁴. En concordancia con nuestros resultados anteriores, la ausencia de marca CFW positiva estaría indicando que los parásitos multinucleados presentes en estas condiciones de cultivo no eran pseudoquistes **(Fig. 9E)**. En conclusión, nuestros resultados demuestran la presencia de parásitos multinucleados que no son pseudoquistes en condiciones de cultivo estándar para *T. foetus*.

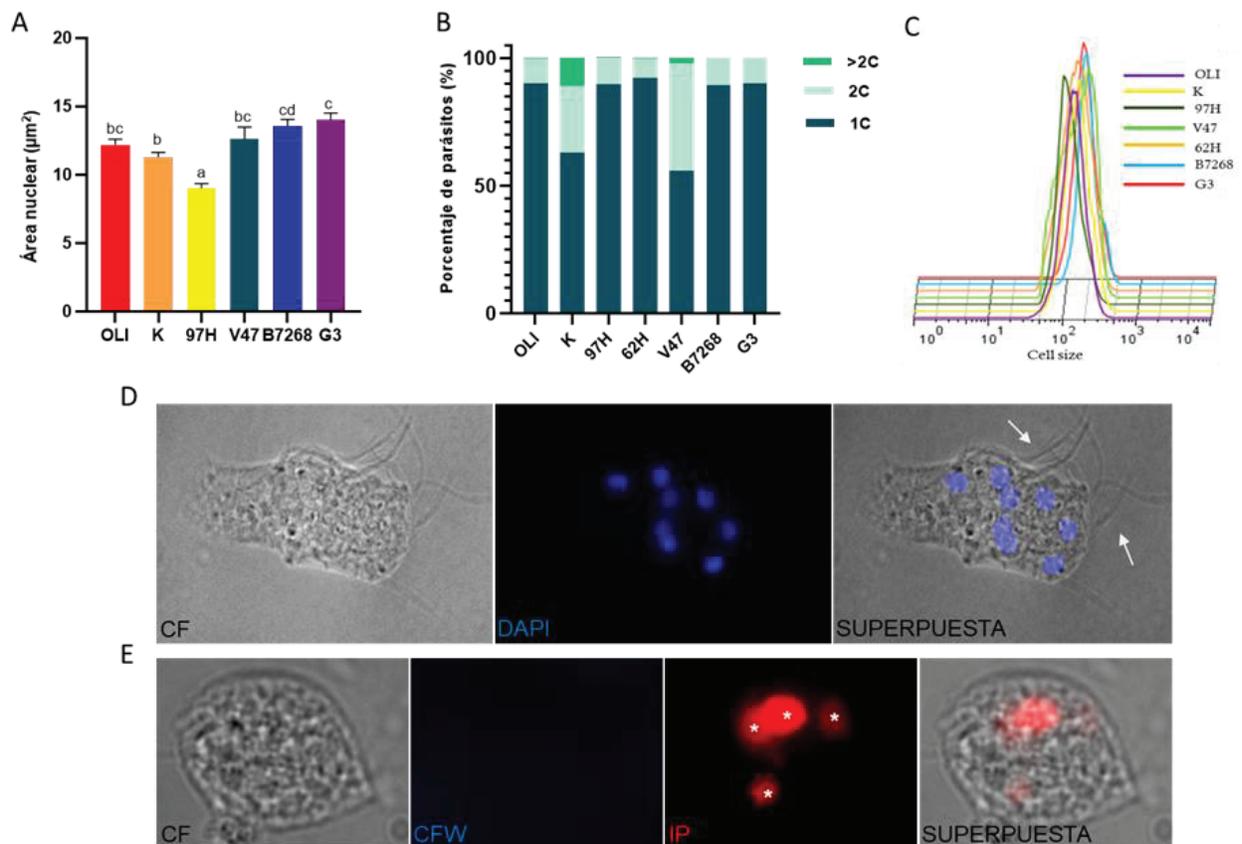


Figura 9: *T. foetus* multinucleados están presentes en condiciones estándar de cultivo. (A) Estimación del tamaño nuclear de *T. foetus* (cepa K y aislamientos OLI, 97H y V47) y *T. vaginalis* (cepas B7268 y G3). Las imágenes de 50 núcleos teñidos con DAPI fueron analizadas utilizando la herramienta de umbral de Image J y la función "Analizar partículas". Los experimentos se llevaron a cabo en triplicado y tres veces independientes. Las diferencias medias se calcularon utilizando la prueba de Kruskal-Wallis con un valor P de 0,05. **(B)** El contenido de ADN de *T. foetus* (OLI, K, 97H, 62H y V47) y de *T. vaginalis* (B7268 y G3) se determinó mediante citometría de flujo. **(C)** Análisis mediante citometría de flujo del tamaño celular de *T. foetus* K, *T. foetus* OLI, K, 97H, V47 y 62H, y *T. vaginalis* B7268 y G3. **(D)** Imagen representativa de un parásito multinucleado de *T. foetus* K con flagelos externos. CF, imagen de contraste de fase. DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Las flechas blancas indican los flagelos externos. **(E)** *T. foetus* con más de 2 núcleos negativo a la tinción con Calcofluor white (azul). Los asteriscos blancos indican los núcleos teñidos con yoduro de propidio (rojo).

La depleción de nutrientes induce la formación de *T. foetus* multinucleados

Para comprender el rol de los parásitos multinucleados y/o pseudoquistes, evaluamos el impacto de la restricción de nutrientes en el medio de cultivo (inducción de estrés nutricional) en la formación de células multinucleadas. Para esto, seleccionamos dos cepas que habitualmente presentan cantidad de núcleos variables en condiciones de cultivo estándar (K y 62H). Los parásitos se sincronizaron mediante una incubación de 12 horas en un medio de cultivo sin suero (Sincro); condición en la que la mayoría de los protozoarios presentan un núcleo único ⁶⁵. Posteriormente, se le agregó suero al medio de cultivo y se monitoreó el crecimiento a las 24 y 36 horas post agregado (sin realizar cambio de medio) hasta su fase de muerte. Además, se tomaron muestras a los diferentes tiempos analizados, se fijaron, se tiñeron los núcleos con DAPI y se cuantificaron mediante microscopía de fluorescencia. En la **Figura 10A** podemos observar la presencia de parásitos multinucleados de *T. foetus* K a las 36 horas en las condiciones de incubación planteadas previamente. En el recuento de núcleos por células mostrado en la **Figura 10B**, en el cultivo de parásitos de *T. foetus* K control, encontramos un 18,7% y un 6% de parásitos con 4 núcleos (4N) y con más de 4 núcleos (>4N), respectivamente. En los parásitos sincronizados, observamos un 5,7% con 4 núcleos y un 0,3% con más de 4 núcleos; lo que sugiere que la falta de nutrientes enriqueció una población de parásitos con 1 solo núcleo. A las 24 horas del agregado de suero, el 18% de los parásitos de *T. foetus* K tenían 4N y el 2,4% tenía >4N. A las 36 horas, los resultados fueron: 27,3% (4N) y 5,6% (>4N). La cepa 62H de *T. foetus* mostró a las 24 horas post agregado de suero un 5,8% y un 0,9% de parásitos con 4N y >4N, respectivamente; mientras que se observó un 0,3% de parásitos con 4N a las 36 horas. Basándonos en estos resultados, concluimos que la depleción de nutrientes induce la formación de parásitos multinucleados, principalmente en la cepa K de *T. foetus*.

Posteriormente, comparamos el contenido total de ADN por parásito en dos condiciones diferentes de depleción de nutrientes: parásitos incubados en ausencia de suero durante 36 horas (condición que denominamos “estrés moderado”) y parásitos incubados durante 36 horas sin cambiar el medio de cultivo (“estrés leve”). En *T. foetus* K observamos un 34,15% y un 50,2% de parásitos con más del doble del contenido de ADN (>2C) en parásitos cultivados en condiciones de estrés leve y moderado, respectivamente. Estos resultados fueron consistentes con los resultados previos, en los cuales en condiciones desfavorables en *T. foetus* K pudimos demostrar la presencia de células multinucleadas. Por otro lado, *T. foetus* 62H presentó un 25,54% de células multinucleadas cuando se incubaron en condiciones de estrés leve; y un 47,57% de parásitos con más del doble del contenido de ADN (>2C) cuando las condiciones de estrés fueron moderadas (**Fig. 10C**). En este análisis concluimos que, si bien el número de núcleos varía en condiciones de estrés nutricional, el contenido de ADN de diferentes cepas de *T. foetus* no mostró diferencias significativas.

Finalmente, analizamos el tamaño de los núcleos de *T. foetus* K y *T. foetus* 62H incubados en condiciones de estrés leve y moderado. Los resultados obtenidos indican que el tamaño promedio de los núcleos fue de 50,54 μm^2 y 34,35 μm^2 para los parásitos *T. foetus* K incubados bajo estrés leve y moderado, respectivamente. En *T. foetus* 62H, el tamaño

promedio de los núcleos fue de $42,65 \mu\text{m}^2$ y $70,35 \mu\text{m}^2$ en parásitos incubados en condiciones de estrés leve y moderado, respectivamente. En este análisis concluimos que la depleción de nutrientes no indujo la formación de parásitos multinucleados, sino que provocó un aumento en el tamaño de los núcleos en *T. foetus* 62H (Fig. 10D).

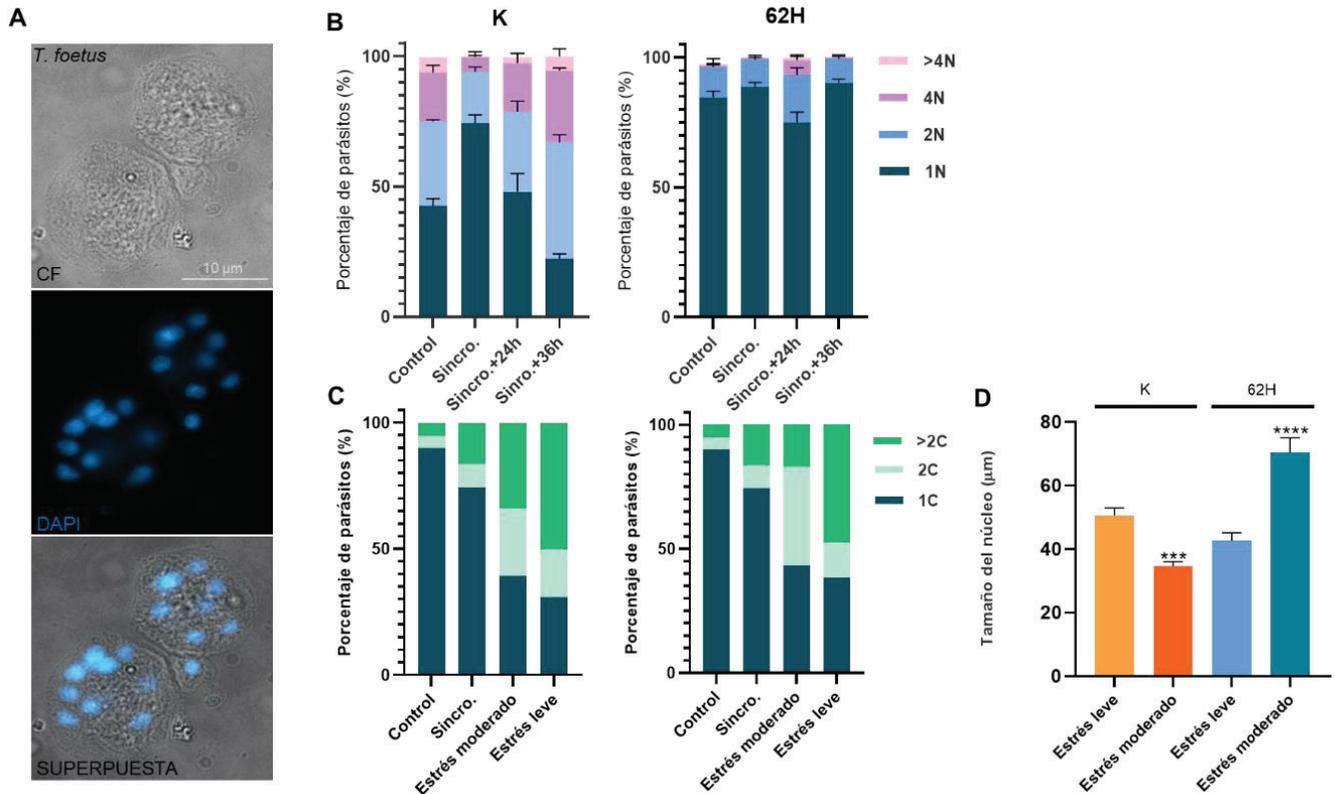
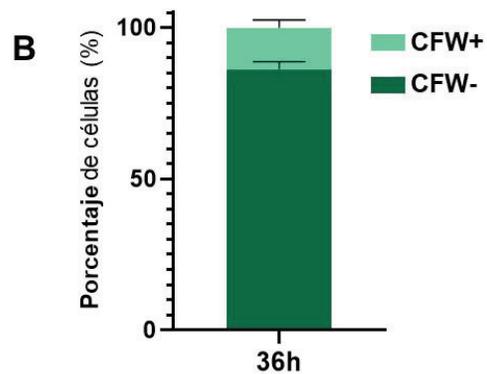
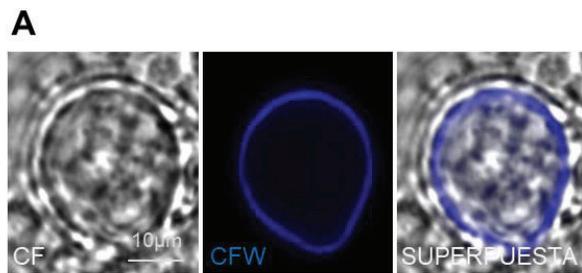


Figura 10: La depleción de nutrientes induce la formación de *T. foetus* multinucleados. (A) Imagen representativa de parásitos multinucleados presentes en condiciones estándar de cultivo. CF: contraste de fase. Los núcleos se marcaron con DAPI. (B) Cuantificación del número de núcleos por parásito teñidos con DAPI de las cepas K y 62H de *T. foetus*. La cuantificación se realizó luego de que los parásitos se cultivaran en: medio de cultivo estándar por 24hs en presencia de suero (Control), en medio de cultivo estándar sin suero por 12 hs (Sincro), parásitos sincronizados + 24hs en medio de cultivo estándar con suero (Sincro + 24 hs) y parásitos sincronizados + 36hs en medio de cultivo estándar con suero (Sincro +36hs). Se muestran los porcentajes de parásitos de diferentes cepas de *T. foetus* con 1, 2, 4 ó más de 4 núcleos. Se contaron cien parásitos de cada población por triplicado en 3 experimentos independientes. Los resultados representan el promedio de 3 experimentos independientes y el error estándar (SE). (C) Perfil del contenido de ADN de parásitos crecidos durante: 24hs en medio de cultivo estándar con suero (Control), 12 horas en medio de cultivo sin suero (Sincro), cultivo de 36 hs en ausencia (Estrés moderado) ó en presencia de suero de equino (Estrés leve) determinado mediante citometría de flujo. (D) Estimación del tamaño nuclear de las cepas K y 62H de *T. foetus* incubadas durante 36 hs en ausencia (Estrés moderado) ó presencia de suero de caballo (Estrés leve), determinado mediante microscopía de epifluorescencia. Se analizaron las

imágenes de 50 núcleos teñidos con DAPI utilizando la herramienta el software Image J. Los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron tres veces. Las diferencias de medias se calcularon utilizando la prueba de Kruskal-Wallis con un valor P de 0,05.

Considerando que observamos la presencia de células multinucleadas en los ensayos de parásitos sometidos a condiciones de depleción de nutrientes, a continuación, evaluamos si los parásitos cultivados durante 36 horas sin cambiar el medio de cultivo eran pseudoquistes. Para esto, los parásitos fueron teñidos con CFW, incubados en condiciones de depleción de nutrientes y analizados mediante microscopía de fluorescencia. Los resultados obtenidos indican que el 13,75% de los parásitos *T. foetus* de la cepa K analizados eran positivos a la marcación con CFW (**Fig. 11A y B**).

Los trofozoítos y los pseudoquistes de *T. foetus* y *T. vaginalis* contienen un citoesqueleto organizado en estructuras altamente diferenciadas; las cuales se denominan pelta-axostilo, la costa y los flagelos. Estas estructuras se encuentran duplicadas antes del inicio de la mitosis (fase S/G2) ^{10 7}. En este contexto, analizamos la distribución del citoesqueleto en parásitos multinucleados obtenidos bajo un ensayo de estrés leve. Para esto, realizamos un ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFA) utilizando un anticuerpo anti- α tubulina y DAPI para la tinción de los núcleos. De acuerdo con reportes previos, detectamos un citoesqueleto (axostilo y flagelos) por cada núcleo de estos parásitos multinucleados (**Fig. 11C**). Lo cual resulta relevante si tenemos en cuenta que el citoesqueleto posee un rol activo durante la citocinesis final de la mitosis y la separación de las células hijas.



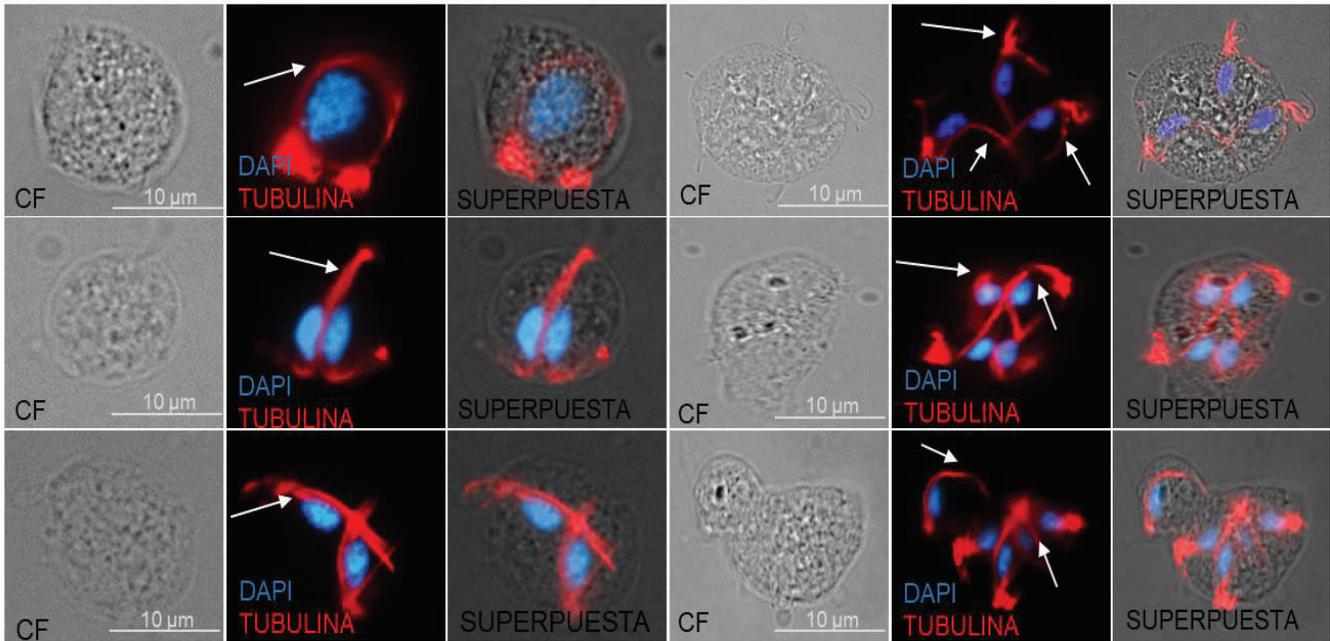
C

Figura 11: Evaluación de la presencia de pseudoquistes y de la distribución de las estructuras citoesqueléticas en parásitos multinucleados durante el agotamiento de nutrientes. (A) Imagen representativa de un parásito *T. foetus* K incubado durante 36 horas sin cambiar el medio de cultivo y marcado con Calcofluor white (CFW). Las muestras se analizaron mediante microscopía de epifluorescencia. Escala, 10 µm. **(B)** Gráfico que representa el porcentaje de parásitos CFW+ y CFW- en muestras de *T. foetus* K mantenidos durante 36 horas sin cambiar el medio de cultivo. Se contaron cien parásitos por triplicado en 3 experimentos independientes. **(C)** Imagen representativa de inmunofluorescencias indirectas realizadas en *T. foetus* K incubados sin cambio de medio durante 36 hs; en las cuales utilizamos un anticuerpo anti- α tubulina (rojo) para visualizar el citoesqueleto (axostilos y flagelos) y DAPI (azul) para marcar los núcleos. CF, imagen de contraste de fase. Las flechas blancas indican una estructura citoesquelética (axostilo y flagelos) en estrecho contacto con cada núcleo. Escala, 10 µm.

La fisión múltiple ocurre durante la división celular de *T. foetus*

Algunos organismos (por ejemplo, algas y algunos protozoos) se dividen regularmente mediante un mecanismo denominado fisión múltiple ⁶⁶ ⁶⁷. En estos casos, el núcleo experimenta varias divisiones mitóticas generando un mayor número de núcleos por célula, luego el citoplasma se separa y una sola célula es capaz de generar numerosas células hijas mononucleadas. Curiosamente, este tipo de fisión celular parental ha sido descrito en algunos organismos cuando se encuentran en condiciones ambientales desfavorables ⁶⁸. Además, este proceso ha sido descrito como parte del ciclo de vida de otros flagelados tricomonadidos; y resulta en la formación de parásitos multinucleados donde cada núcleo

da lugar a la formación de una célula hija ⁶⁷. En este contexto, decidimos evaluar si los parásitos multinucleados que se están formando en condiciones desfavorables de cultivo podrían llevar adelante el proceso de fisión múltiple. Nosotros hipotetizamos que, en el caso de existir fisión múltiple, la cantidad de parásitos que se deberían generar debería ser mayor que si la división se diese por división mediante fisión binaria longitudinal. Teniendo en cuenta esto, evaluamos si los parásitos sometidos a condiciones nutricionales de estrés leve eran capaces de dar lugar a numerosos parásitos individuales al restablecerles el medio de cultivo estándar. Para tal fin, los parásitos *T. foetus* de la cepa K sometidos a una carencia de nutrientes leve, así como también parásitos control (no sometidos a estrés) fueron transferidos a medios de cultivo frescos ricos en nutrientes para luego evaluar su tasa de crecimiento. Los parásitos fueron contados al cumplirse las 36 horas de cultivo en el mismo medio de cultivo y 4 horas después de haberles realizado el cambio de medio. Nuestros resultados demostraron que la tasa de crecimiento de los parásitos sometidos a un estrés nutricional fue mayor que los parásitos control, incubados en medio de cultivo completo durante 36 horas. Por otra parte, aquellos parásitos sometidos a un estrés nutricional moderado (medio sin suero durante 36 horas) no fueron capaces de completar la división celular con la misma eficiencia (**Fig. 12A**).

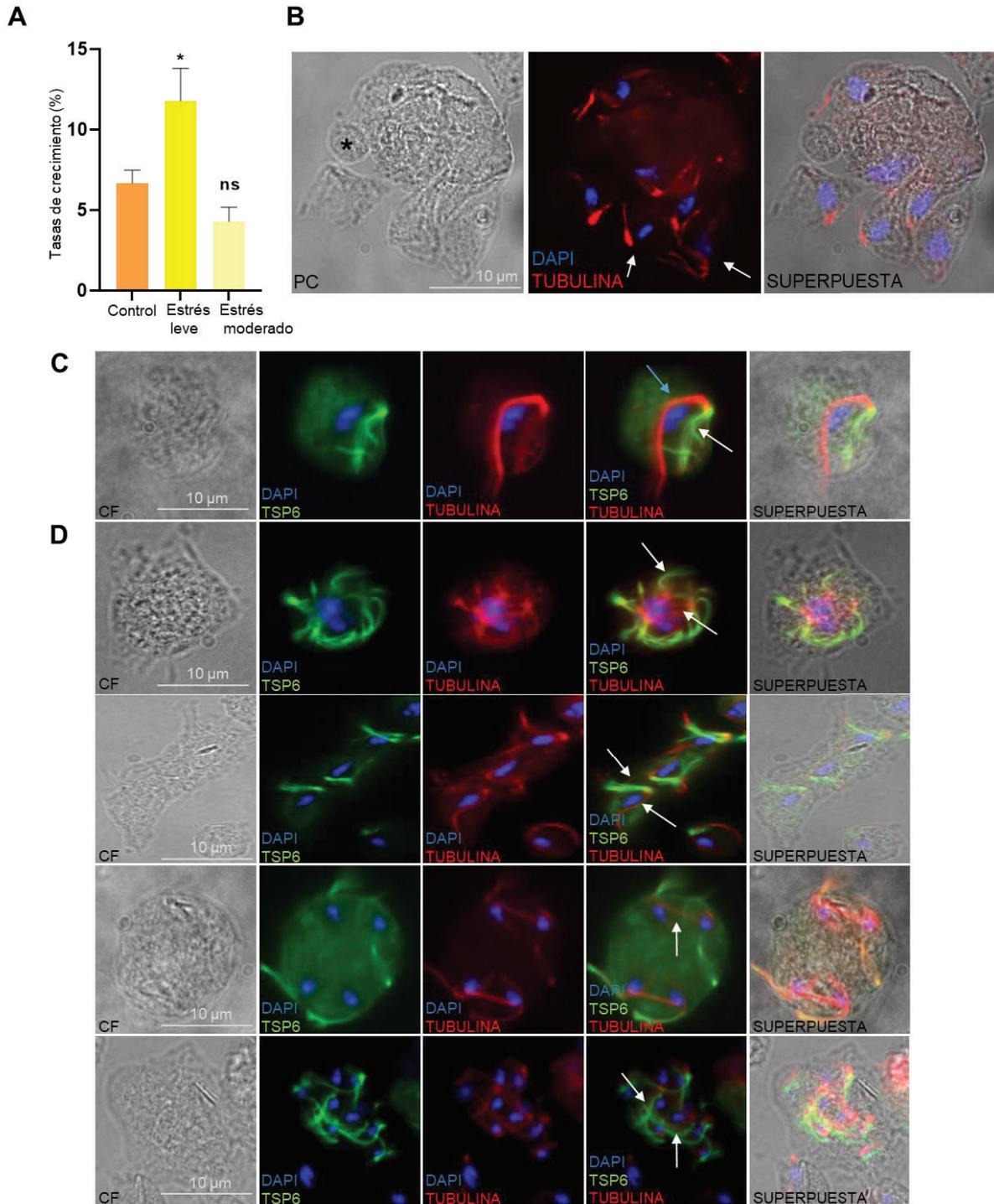


Figura 12: Análisis del egreso de *T. foetus* a partir de parásitos multinucleados. (A) Análisis comparativo de las tasas de crecimiento de parásitos cultivados en condiciones estándar (Control), de parásitos mantenidos en el mismo medio de cultivo completo durante 36 horas (Estrés leve), y parásitos incubados en un medio sin suero durante 36 horas (Estrés moderado). Se contaron los parásitos transferidos al medio de cultivo completo a la 0 hora y a las 4 horas posteriores. Las barras

de error representan el error estándar, y los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba de Welch. **(B)** Imagen representativa del egreso de parásitos individuales a partir de una célula multinucleada, donde pueden observarse las estructuras del citoesqueleto asociadas a cada núcleo; las cuales fueron marcadas con un anticuerpo anti- α tubulina (rojo) y DAPI (azul) para visualizar los núcleos. CF: contraste de fase. Las flechas blancas indican la estructura citoesquelética relacionada a cada núcleo. El asterisco negro indica la presencia de un "zoide". Escala, 10 μ m. **(C)** Inmunofluorescencia indirecta de parásitos *T. vaginalis* que sobreexpresan la proteína de flagelo TvTSP6-HA en condiciones estándar de crecimiento, y que fueron marcados con un anticuerpo anti-HA (verde). El axostilo y los flagelos se marcaron con un anticuerpo anti- α tubulina (rojo), los núcleos se marcaron con DAPI (azul) y se analizaron mediante microscopía de epifluorescencia. Las flechas blancas indican los flagelos, y las flechas azules indican el axostilo (estructura citoesquelética relacionada con el núcleo). Escala, 10 μ m. **(D)** Las imágenes muestran parásitos multinucleados de *T. vaginalis* que sobreexpresan la proteína de flagelo TvTSP6-HA incubados sin cambio de medio durante 36 horas. Se realizó una inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo anti-HA (verde). El citoesqueleto se marcó con un anticuerpo anti- α tubulina (rojo), y los núcleos se marcaron con DAPI (azul). Las flechas blancas indican la estructura citoesquelética (axostilo y flagelos) relacionada con cada núcleo. Escala, 10 μ m.

Para examinar detalladamente el proceso de egreso en los parásitos multinucleados y poder diferenciar axostilos y flagelos de manera inequívoca, decidimos incluir en nuestros análisis parásitos *T. vaginalis* sobreexpresando una proteína de flagelo (TvTSP6-HA)⁵⁵. Parásitos *T. foetus* K y TvTSP6-HA fueron incubados en los mismos medios de cultivo durante 36 horas para inducir un estado de estrés nutricional leve y luego colocados en medios de cultivo frescos durante 2 horas adicionales. Luego, los parásitos fueron fijados y realizamos una inmunofluorescencia indirecta (IFA) utilizando un anticuerpo anti- α tubulina, DAPI para la tinción nuclear de *T. foetus*; así como también un anticuerpo anti-HA en el caso de los parásitos TvTSP6-HA (*T. vaginalis*).

En *T. foetus* (**Fig. 12B**) y *T. vaginalis* (**Fig. 12C**) pudimos determinar que, al restablecerles el medio de cultivo estándar, cada núcleo de los parásitos multinucleados se encontraba asociado a un axostilo y en el caso de los parásitos TvTSP6-HA podemos visualizar claramente los flagelos en cercanía de los núcleos y de los axostilos. Teniendo en cuenta el rol que poseen ambas estructuras en la citocinesis final de la mitosis, el posicionamiento de estas estructuras sugiere que cada núcleo está preparado para el egreso.

Por otro lado, nuestros resultados estarían indicando que la división celular en estos organismos puede ocurrir en cualquiera de los tres planos: longitudinal, oblicuo y transversal (**Fig. 12B y C, y Fig. 13A**). Curiosamente, en estos ensayos observamos la presencia de parásitos *T. foetus* y *T. vaginalis* sin núcleos (**Fig. 13B y C**). Este tipo de estructuras, denominadas "zoides", se ha observado previamente en otros organismos y se demostró que se forman cuando la segregación de núcleos y/o su coordinación con la citocinesis durante la formación de las células hijas parecen estar comprometidas^{50 69}. La presencia de zoides en nuestros ensayos podrían estar sugiriendo la existencia de una división desigual de las células multinucleadas. En este sentido, mediante una marcación

con anti- α tubulina, pudimos observar que las estructuras de tipo zoides no contenían estructuras del citoesqueleto clásicas (**Fig. 12B y Fig. 13C**).

En resumen, *T. foetus* K y la cepa CDC1132 de *T. vaginalis* forman células multinucleadas en condiciones de agotamiento de nutrientes; siendo éste un proceso reversible al restablecerles las condiciones estándar de cultivo. Por lo tanto, estas formas multinucleadas en estado latente podrían ser utilizadas por estos parásitos como estrategia de supervivencia y división en condiciones de estrés.

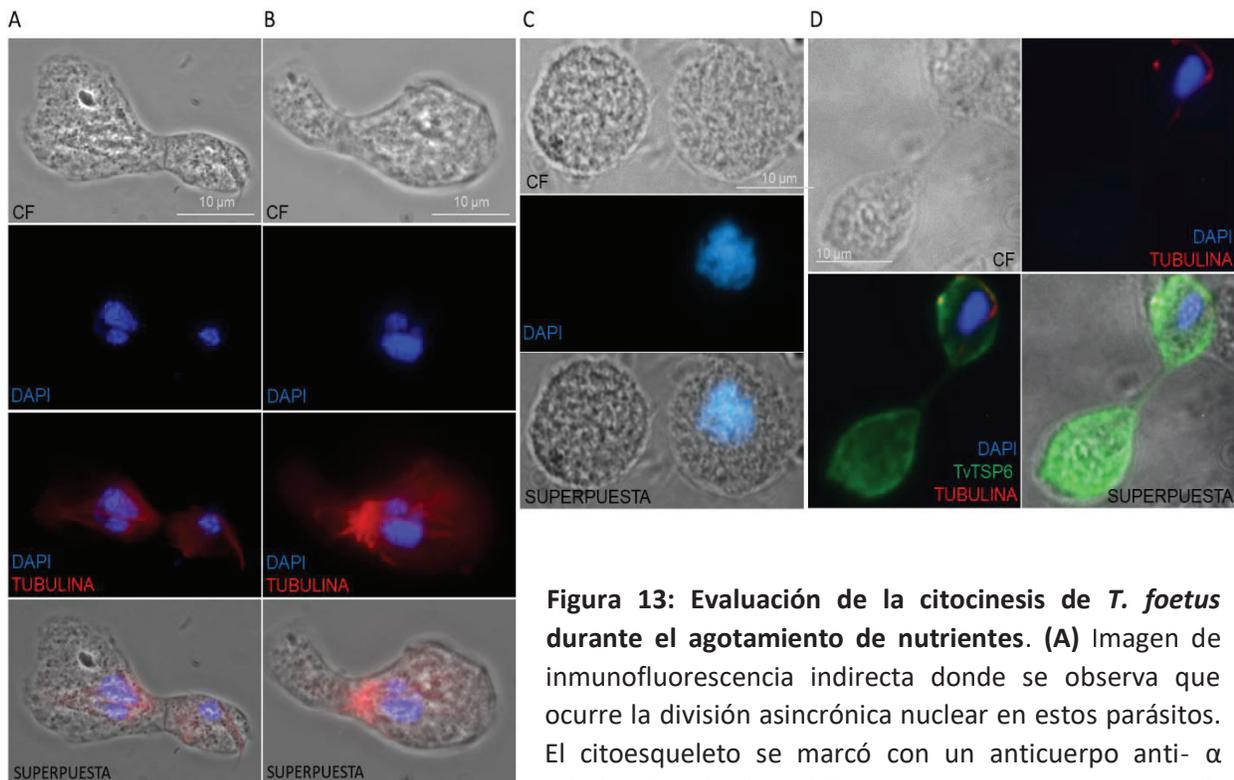


Figura 13: Evaluación de la citocinesis de *T. foetus* durante el agotamiento de nutrientes. (A) Imagen de inmunofluorescencia indirecta donde se observa que ocurre la división asincrónica nuclear en estos parásitos. El citoesqueleto se marcó con un anticuerpo anti- α tubulina (rojo), y los núcleos se marcaron con DAPI (azul). Escala, 10 μ m. **(B)** Imagen de inmunofluorescencia donde se observa la formación de una célula hija sin núcleo (zoide). El citoesqueleto se marcó con un anticuerpo anti- α tubulina. CF, contraste de fase y DAPI (azul). Escala 10 μ m. **(C)** Imagen representativa de las células hijas enucleadas (zoides) de *T. foetus* 62H. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala, 10 μ m. **(D)** Imagen de inmunofluorescencia indirecta donde pueden observarse células hijas enucleadas (zoides) en parásitos TvTSP6 durante la citocinesis. El citoesqueleto se marcó con un anticuerpo anti- α tubulina (rojo), TvTSP6 se marcó con un anticuerpo anti-HA (verde), y los núcleos se marcaron con DAPI (azul). Escala, 10 μ m.

Escala, 10 μ m. **(B)** Imagen de inmunofluorescencia donde se observa la formación de una célula hija sin núcleo (zoide). El citoesqueleto se marcó con un anticuerpo anti- α tubulina. CF, contraste de fase y DAPI (azul). Escala 10 μ m. **(C)** Imagen representativa de las células hijas enucleadas (zoides) de *T. foetus* 62H. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala, 10 μ m. **(D)** Imagen de inmunofluorescencia indirecta donde pueden observarse células hijas enucleadas (zoides) en parásitos TvTSP6 durante la citocinesis. El citoesqueleto se marcó con un anticuerpo anti- α tubulina (rojo), TvTSP6 se marcó con un anticuerpo anti-HA (verde), y los núcleos se marcaron con DAPI (azul). Escala, 10 μ m.

La privación de nutrientes induce la formación de parásitos esféricos con un solo núcleo de mayor tamaño

A continuación, evaluamos lo que sucedía con los núcleos al incubar *T. foetus* en ausencia total de nutrientes (condición que denominamos “estrés severo”). Inicialmente, *T. foetus* K fueron incubados en agua durante 24 y 48 horas (estrés severo) y luego se cuantificaron los núcleos por célula, utilizando la tinción con DAPI. La incubación bajo condiciones de estrés nutricional severo indujo la transformación de trofozoítos piriformes en formas esféricas (**Fig. 14A**). Teniendo en cuenta esta observación, evaluamos si dichas estructuras eran pseudoquistes mediante la determinación de la localización de los flagelos, utilizando el anticuerpo anti- α tubulina. Los resultados obtenidos demuestran que en estos parásitos los flagelos se encontraban internalizados (**Fig. 14B**). Para determinar si las estructuras esféricas observadas bajo condiciones de estrés nutricional severo podrían ser células multinucleadas, determinamos el número de núcleos por parásito a las 24 y 48 horas de incubación en agua. A las 24 horas, el 54,6%, el 38,3% y el 6,3% de los parásitos contenían 1, 2 y más de 2 núcleos por parásito, respectivamente. A las 48 horas, los porcentajes de parásitos con 1, 2 y más de 2 núcleos fueron del 76,6%, 21,3% y 3,6%, respectivamente (**Fig. 14C**). Cuando los parásitos tenían 1 único núcleo, éste era de un tamaño mayor al compararlo con los núcleos de los parásitos utilizados como control (**Fig. 14D y E**).

Para evaluar si estas células redondeadas con flagelos internalizados podían ser pseudoquistes, los parásitos se tiñeron con CFW. El 8,6% y el 12,6% de los parásitos mantenidos durante 24 y 48 horas en agua resultaron positivos al CFW, respectivamente (**Fig. 14F**). Por último, evaluamos el contenido de ADN de los parásitos incubados en agua mediante citometría de flujo. Como control, analizamos el contenido de ADN de los parásitos *T. foetus* K incubados durante 24 horas en medios de cultivo estándar. Como se puede ver en la **Figura 14G**, el 76% de los parásitos incubados en condiciones de estrés nutricional severo mostraron más del doble de contenido de ADN. A continuación, para evaluar si existe la capacidad de revertir el fenotipo, los parásitos mantenidos en el agua durante 24 horas se transfirieron al medio TYM y se incubaron durante 24, 48 y 72 horas para ver si las estructuras esféricas obtenidas en condiciones de estrés nutricional severo eran capaces de transformarse en trofozoítos y potencialmente multiplicarse (**Fig. 14H**). Luego de 24 horas de incubación en el medio de cultivo rico en nutrientes, 71% de los parásitos eran trofozoítos piriformes móviles y un 29% de parásitos con forma esférica. A las 48 horas, los porcentajes de trofozoítos piriformes y aquellos con forma esférica observados en el cultivo, fueron del 93% y del 7%, respectivamente. Finalmente, observamos la presencia de un 100% de trofozoítos piriformes luego de que las células permanecieran 72 horas en medio de cultivo estándar (**Fig. 14H**).

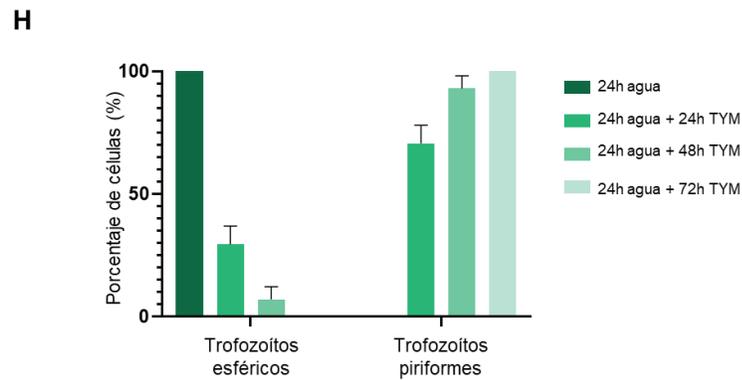
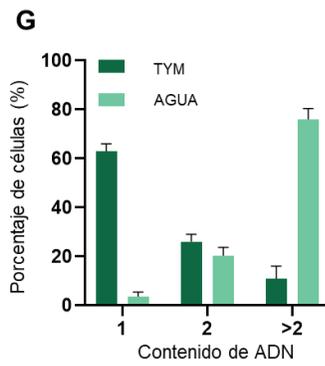
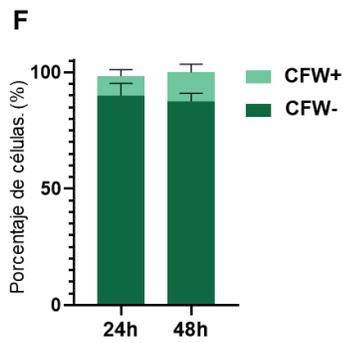
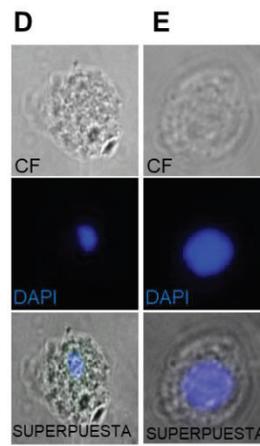
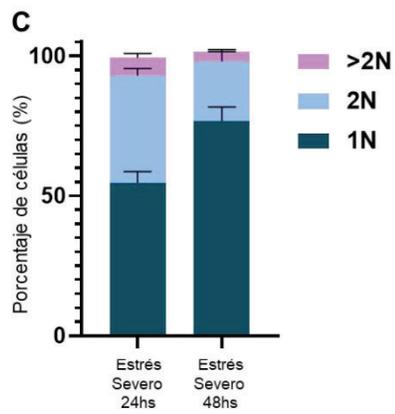
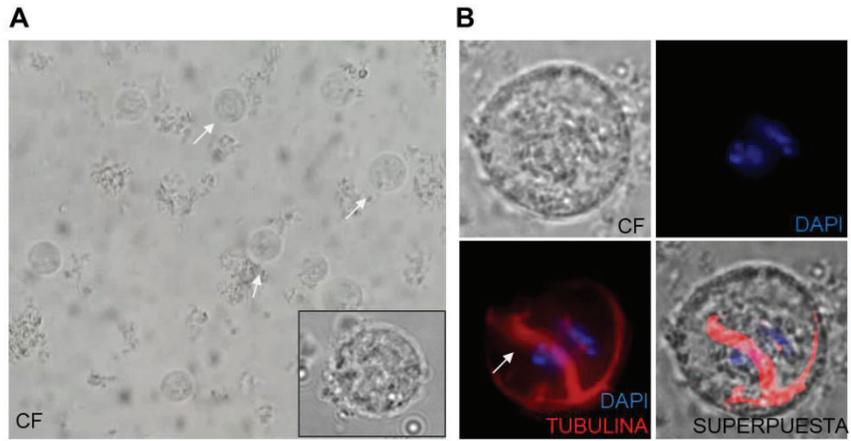


Figura 14: Análisis de los núcleos de *T. foetus* durante la privación de nutrientes. (A) Imagen representativa de contraste de fase de *T. foetus* después de 24 horas de incubación en agua. Las flechas blancas indican los trofozoítos esféricos. **(B)** Inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo anti- α tubulina donde se observan parásitos esféricos con flagelos internalizados (flecha blanca). DAPI (azul). CF, imagen de contraste de fase. Escala, 10 μ m. **(C)** Gráfico que muestra el número de núcleos de parásitos incubados en agua durante 24 y 48 horas. 1N, un núcleo; 2N, dos núcleos; >2N, tres o más núcleos. **(D-E)** Imágenes representativas del tamaño de los núcleos de *T. foetus* incubados en medio de cultivo (Control) (D) y *T. foetus* incubados en agua durante 48 horas **(E)**. Escala, 10 μ m. **(F)** Gráfico que muestra el porcentaje de parásitos CFW+ y CFW- en muestras de *T. foetus* K incubados en agua durante 24 y 48 horas. Se contaron cien parásitos por triplicado en 3 experimentos independientes. **(G)** Gráfico que representa el contenido de ADN de *T. foetus* K incubados en medio de cultivo TYM (TYM) durante 24 horas y en agua durante 24 horas. El contenido de ADN se determinó mediante citometría de flujo. **(H)** Gráfico del porcentaje de trofozoítos piriformes y esféricos presentes en *T. foetus* K mantenidos en agua durante 24 horas y recuperados en medio TYM durante 24 horas, 48 horas y 72 horas. **(C, F, G y H)**. Las barras representan los promedios de cada ensayo y sus errores estándar.

Un análisis más detallado nos permitió determinar que un único núcleo presente en los parásitos tratados fue capaz de “fragmentarse” en varios núcleos más pequeños, 4 horas después del suministro de nutrientes **(Fig. 15A-B)**. Estos resultados indican que los parásitos esféricos que se forman en condiciones de privación de nutrientes, con un solo núcleo y un contenido de ADN de más de 1C; pueden revertir a trofozoítos móviles cuando se restablece el suministro de nutrientes, sugiriendo que estas estructuras podrían considerarse formas “dormidas” de estos parásitos.

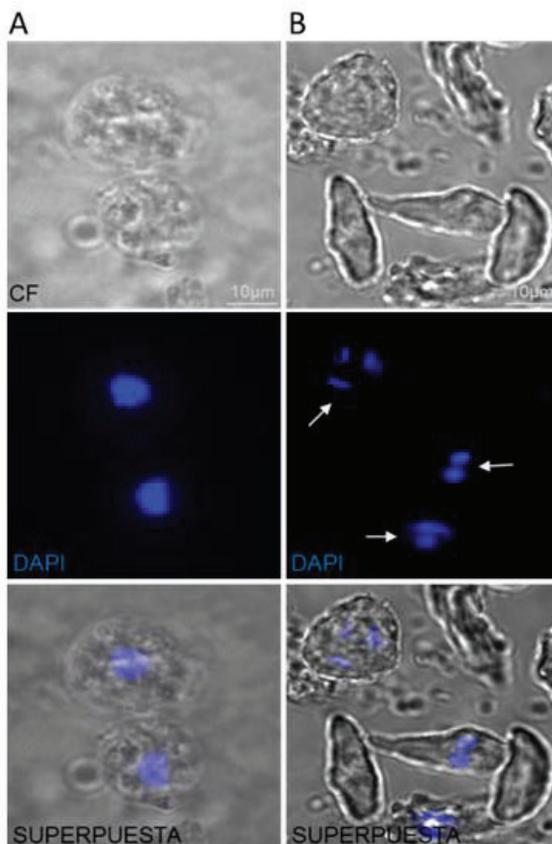


Figura 15: Comparación de los núcleos de *T. foetus* durante la privación de nutrientes y la posterior restitución de nutrientes. (A) Imagen representativa de *T. foetus* incubados en agua durante 24 horas (trofozoítos esféricos). Escala, 10 μ m. **(B)** Imagen representativa de *T. foetus* incubados en agua durante 24 horas y recuperados en medio TYM durante 4 horas (trofozoítos piriformes). Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). CF, contraste de fase. Las flechas blancas indican la presencia de numerosos núcleos más pequeños. Escala, 10 μ m.

La endoreplicación del genoma puede ocurrir durante el ciclo celular de *T. foetus*

El ciclo de endoreplicación es una variante del ciclo celular en el cual las células aumentan el contenido de su ADN genómico sin dividirse. Como antecedente, se sabe que la endoreplicación es una característica intrínseca del protozooario *Entamoeba histolytica*, y que la formación de células multinucleadas en este organismo es favorecida por la ausencia de nutrientes^{70 71}. Teniendo en cuenta lo antes expuesto, evaluamos si las células con más de 1 núcleo o con núcleos más grandes observadas en *T. foetus* en condiciones de estrés, estaban replicando activamente el ADN. Realizamos una inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente el "antígeno nuclear de células en proliferación" (anti-PCNA) para determinar la replicación activa del ADN en parásitos bajo condiciones de estrés^{72 73}. Detectamos células de *T. foetus* positivas para PCNA cuando los parásitos se cultivaron durante 36 horas en condiciones de estrés leves (**Fig. 16A**); lo que indica que, cuando la disponibilidad de nutrientes es baja, la maquinaria de replicación se encuentra activa en estos parásitos.

Para validar estos resultados, realizamos un ensayo utilizando bromodesoxiuridina (BrdU), un análogo de timidina que se administra exógenamente y se incorpora en las células en replicación. *T. foetus* sometidos a condiciones de privación de nutrientes se incubaron con BrdU durante 2 horas; y luego realizamos una inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo anti-BrdU. En concordancia con nuestros resultados anteriores, detectamos núcleos positivos para BrdU (**Fig. 16B**); lo que también nos estaría indicando que el ADN se está sintetizando activamente sin que las células se dividan. Estos resultados nos sugieren que *T. foetus* posee la capacidad de utilizar un ciclo celular alternativo (endoreplicación), cuando está expuesto a un estrés de tipo nutricional.

Finalmente, para confirmar que en estos parásitos ocurría la endoreplicación del ADN, utilizamos colchicina, que es una droga que bloquea el ciclo celular en G2-M e induce la ocurrencia de este proceso alternativo en aquellas células que cuentan con la maquinaria y la regulación para llevarlo adelante⁷⁴. Tratamos los parásitos con 1.5 mM de colchicina durante 18 horas y cuantificamos el contenido de ADN mediante citometría de flujo. Como se observa en la **Figura 16D**, los parásitos tratados con esta droga mostraron un 16,5%, 44,5% y 38,5% de células con contenidos de ADN de 1C, 2C y más de 2C, respectivamente. Mientras que, en los parásitos no tratados, los porcentajes fueron del 83%, 10% y 7% para contenidos de ADN de 1C, 2C y más de 2C, respectivamente. Además, corroboramos mediante tinción de los núcleos con DAPI, la presencia de núcleos de mayor tamaño (**Fig. 16E y F**). Concluimos entonces que *T. foetus* es capaz replicar activamente y aumentar su contenido de ADN cuando se encuentra en condiciones de estrés, mediante un proceso conocido como endoreplicación del ADN.

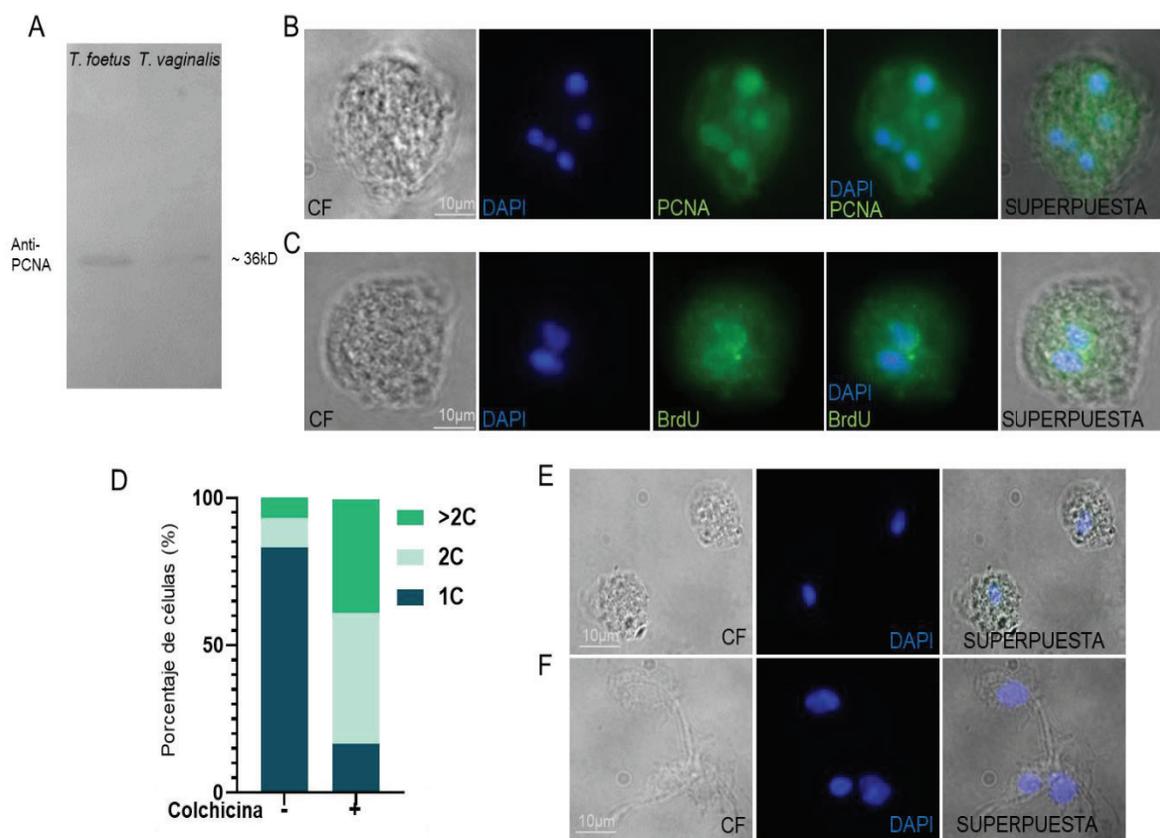


Figura 16: Proceso de reduplicación del genoma en *T. foetus*. (A) Western blot confrontando el extracto proteico total de *T. foetus* y *T. vaginalis* con el anticuerpo anti-PCNA, donde puede observarse la marca acorde al peso molecular esperado (36kDa). (B) Inmunofluorescencia indirecta que muestra los núcleos positivos para PCNA (verde) de parásitos *T. foetus* que se incubaron en el mismo medio durante 36 horas. DAPI (azul). CF, imagen de contraste de fase. Barra de escala, 10 μm. (C) Inmunofluorescencia indirecta de núcleos positivos para BrdU (verde) de parásitos *T. foetus* K que fueron privados de suero durante 12 horas, antes de ser incubados con BrdU durante 2 horas. DAPI (azul). CF, imagen de contraste de fase. Barra de escala, 10 μm. (D) Representación del perfil de contenido de ADN de *T. foetus* K tratados con colchicina (y los parásitos no tratados como control). 1C, 2C o >2C, contenido de ADN. (E a F) Imagen representativa de trofozoítos de *T. foetus* incubados en medio de cultivo con 1% de DMSO (control) y *T. foetus* incubados en medio de cultivo con colchicina durante 18 horas. Barra de escala, 10 μm.

Identificación de posibles genes involucrados en el proceso de endoreplicación del ADN en *T. foetus*

Finalmente, con el propósito de identificar los genes que podrían estar involucrados en el proceso de endoreplicación del ADN en *T. foetus*; realizamos un análisis transcriptómico de parásitos incubados en condiciones estándar de cultivo (control) y de parásitos incubados

en condiciones de estrés nutricional (endoreplicando su ADN). Luego, identificamos los transcritos regulados diferencialmente; y analizamos en detalle aquellos genes que en otros tipos celulares han sido relacionados con el ciclo celular (**Fig. 17**). Entre los genes que mostraron una expresión baja con respecto al control (parásitos no tratados), pudimos detectar a las ciclinas A, B, C y D; Aurora kinasa A, SMCa y SMCb, MCM2, MCM6B, MCM2-3-5, CKS2, CDC2, CEP44 y zf-DNA_pol.

En cuanto a lo que se ha descrito en otras células para estos genes; en mamíferos por ejemplo la progresión adecuada del ciclo celular depende del nivel de expresión de las ciclinas y de la posterior activación de las quinasas dependientes de ciclinas (Cdk). Entre las ciclinas conocidas se destacan las A, B, C, D y E. El ciclo de división celular de mamíferos muestra una distribución diferente de actividades de las ciclinas de tipo C y D, las cuales controlan la entrada al ciclo celular y la progresión de la fase G1, las ciclinas de tipo E que controlan la entrada en S (síntesis de ADN.); las ciclinas de tipo A controlan diferentes aspectos de la replicación y progresión del ADN a través de la fase G2, y las ciclinas de tipo B son los principales reguladores de la entrada en la mitosis (M) y la segregación cromosómica ⁷⁵. En este contexto, existen trabajos que demuestran que durante la endoreplicación cesa la expresión de ciclina B ó de la ciclina A en mamíferos ⁷⁶. Y se ha definido la existencia de una red mitótica regulada por ciclina A en *Drosophila*, cuya regulación negativa promueve el cambio de ciclos mitóticos a ciclos de endoreplicación ⁷⁷.

En cuanto a las auroras quinasas; la mayoría de las células animales contienen dos quinasas relacionadas, Aurora A y B; las cuales tienen localizaciones distintas y funciones especializadas durante la mitosis y la proliferación celular. Aurora A se localiza en los centrosomas y los microtúbulos del huso, y participa en la maduración del centrosoma, la entrada mitótica y el ensamblaje del huso. Aurora B se localiza en el centrómero interno y la zona media del huso, y participa principalmente en el punto de control (*checkpoint*) del ensamblaje del huso, la unión del cinetocoro y la citocinesis. Se ha reportado que ambas regulan casi todas las etapas cruciales de la fase M, desde la condensación y separación de los cromosomas hasta el final de la citocinesis ^{78 79}. Se ha reportado que en *Drosophila* la aurora B participa en la red de señales que determina si la célula prosigue la mitosis clásica o cambia a la endoreplicación del ADN ⁷⁷. Ensayos de sobreexpresión de la aurora A en células de mamífero demostraron que no desregula la duplicación del centrosoma, sino que da lugar a centrosomas adicionales a través de defectos en la división celular y la consiguiente tetraploidización ⁸⁰.

La condensina es un complejo proteico (SMC) multi-subunitario que regula la condensación y segregación cromosómica durante la división celular. Los complejos de proteínas SMC proporcionan estructura a los cromosomas, por ende, dichas proteínas se encuentran relacionadas con la segregación cromosómica durante la mitosis, el control de la transcripción, de la replicación, y de la reparación y recombinación del ADN ^{81 82}. La investigación focalizada en la pérdida de función de proteínas SMC en *Plasmodium spp.*, un

parásito que experimenta mitosis cerrada y endoreplicación durante su ciclo de vida indican que estas proteínas son requeridas para la proliferación y transmisión de dicho parásito.

La ADN polimerasa alfa (pol1) es un componente del complejo de iniciación y es esencial para el control del punto de control de la fase S. Se ha descrito que la eliminación de pol1 conduce a una mitosis aberrante y sugieren que la ADN polimerasa alfa es necesaria para la señal del punto de control que previene la mitosis si la síntesis de ADN es incompleta o defectuosa ⁸³.

La familia de proteínas MCMs (2-7) (*Mini Chromosome Maintenance*) son factores esenciales para la replicación del ADN que se conservan desde las arqueobacterias hasta las levaduras y los humanos. En los ciclos mitóticos, los MCMs se asocian con la cromatina antes de la replicación del ADN, se disocian de la cromatina a medida que avanza la fase S y están ausentes en la cromatina post-replicación ^{84 85}. Los estudios realizados en *Drosophila*, organismos que experimentan tanto ciclos mitóticos como endociclos, han revelado que el gen *dpa*, homólogo al gen MCM, desempeña un papel esencial en la replicación del ADN en células que están experimentando proliferación mitótica, pero no en células sometidas a endoreplicación ⁸⁶.

Las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) son la maquinaria central que regula la progresión a través del ciclo celular. Estas son quinasas de proteínas serina/treonina que fosforilan sustratos clave para promover la síntesis de ADN y la progresión mitótica. Las subunidades catalíticas carecen de actividad hasta que se unen a sus subunidades de ciclina correspondientes, las cuales están reguladas de manera estricta tanto a nivel de síntesis como de proteólisis dependiente de la ubiquitina. La unión de la ciclina permite que las CDK inactivas adopten una configuración activa similar a las quinasas monoméricas y activas ⁸⁷. En *Drosophila* oscilaciones de la Ciclina E/Cdk2 impulsan los endociclos. Específicamente, se requiere un período de baja actividad de la Ciclina E/Cdk2 para permitir endociclos sucesivos ^{35 88}.

El centrosoma lleva a cabo diversas funciones, incluida la nucleación y organización de microtúbulos. Se ha encontrado que proteínas centrosomales (CEPs) están involucradas en regular la nucleación, estabilidad y dinámica de los microtúbulos ⁸⁹. El ciclo del centrosoma se coordina con mayor frecuencia con la división celular mitótica a través de la actividad de diversos reguladores esenciales del ciclo celular, asegurando consecuentemente que el centríolo se duplique una sola vez por ciclo celular. Las células gigantes del trofoblasto (TGCs) en la placenta experimentan endociclos, lo que conduce a la poliploidía, un aumento en la cantidad de ADN en estas células. Sin embargo, es notable que, a pesar de este incremento en el contenido de ADN, no se observa un aumento correspondiente en el número de centrosomas en estas células ⁹⁰. En estas células estos centríolos se desvinculan de la replicación del ADN, adquieren proteínas del centrosoma y pueden nuclear microtúbulos. En las TGCs el bloqueo de la formación de los centrosomas no afecta la progresión de los endociclos ⁹⁰.

Entre los genes que mostraron expresión alta con respecto al control (parásitos no tratados) pudimos detectar a, Aurora B, RAD51A y DEAD/DEAH.

Como mencionamos anteriormente la Aurora B participa principalmente en el punto de control (*checkpoint*) del ensamblaje del huso, la unión del cinetocoro y la citocinesis. La alteración de cada uno de estos pasos podría inducir aneuploidía, una de las principales características y fuerzas impulsoras de las células cancerosas. La deficiencia de Aurora B interfiere con el ciclo celular. Las células deficientes en esta proteína no pueden dividirse después de la mitosis y se vuelven tetraploides, con dos copias de centrosomas ⁹¹.

Finalmente, RAD51 es una de las proteínas involucradas en la replicación fiel del ADN, así como también en la reparación y la recombinación del mismo ⁹². Por otro lado, las helicasas de ARN de la familia DEAD/DEAH-box son proteínas altamente conservadas que se unen al ARN y poseen actividad ATPasa. Son cruciales para el metabolismo del ARN, desempeñando roles importantes en procesos tales como la síntesis, procesamiento y transporte del ARN; siendo por ende esenciales para la regulación de la expresión ⁹³. Estudios recientes demostraron que las ARN helicasas participan en la regulación de cada una de las fases durante la progresión del ciclo celular: la transición G1-S, la fase S, la transición G2-M, la mitosis y la citocinesis⁹⁴. En *G. lamblia* demostraron que 20 proteínas DEAD/DEAH-box estaban reguladas positivamente en condiciones de estrés; y que la expresión de 16 ARN helicasas eran moduladas durante el proceso de variación antigénica. En base a estas observaciones, han sugerido que las ARN helicasas DEAD/DEAH-box podrían regular la expresión génica durante los procesos adaptativos, en este parásito ⁹⁵.

En conclusión, en este análisis hemos podido identificar diferentes genes candidatos para futuros estudios enfocados en el proceso de endoreplicación del ADN en *T. foetus*.

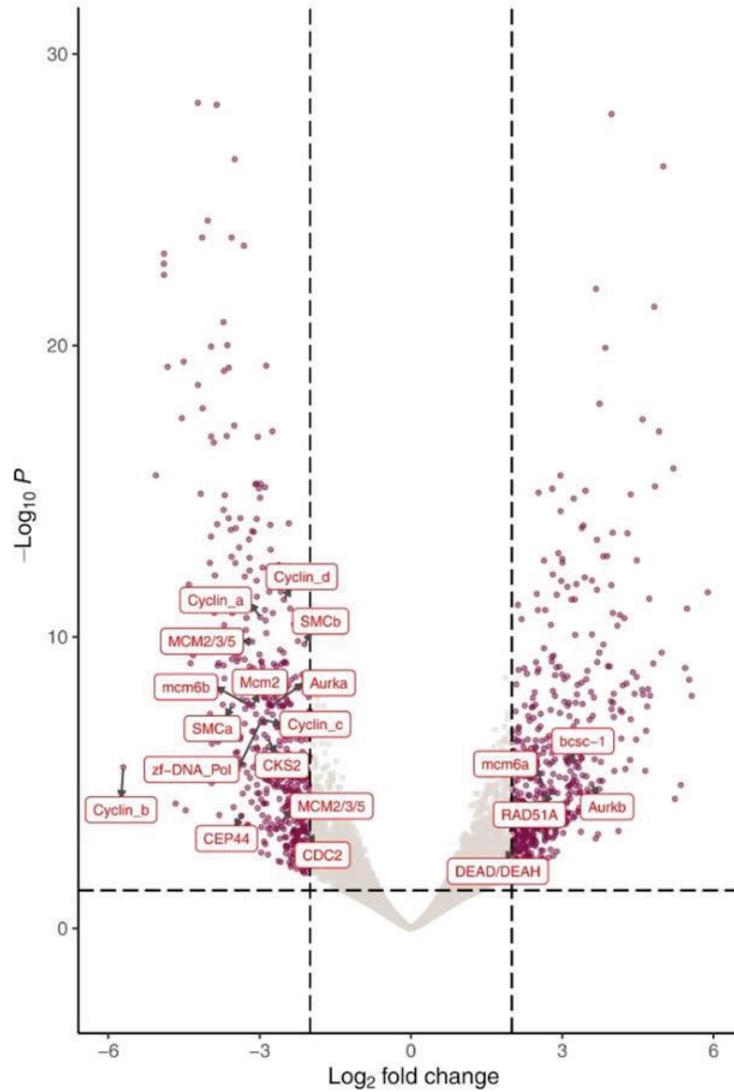


Figura 17: Gráfico de Volcano plot que muestra los genes expresados diferencialmente al comparar parásitos incubados en condiciones de estrés moderado y parásitos control. El gráfico muestra la magnitud del cambio (*fold change*) y la significación estadística (valor P ajustado). Los genes diferencialmente expresados se graficaron como puntos de color violeta. A la derecha se encuentran los regulados positivamente y a la izquierda aquellos regulados negativamente, en relación al control (sin estresar). El gráfico fue realizado con el paquete EnhancedVolcano ⁹⁶.

DISCUSIÓN DEL CAPITULO 1

Al igual que en la mayoría de los organismos vivos, en *Tritrichomonas foetus*, la división celular se consideraba un proceso mediante el cual se generaban dos células hijas mononucleadas e idénticas, a partir de una única célula madre. Sin embargo, en el presente trabajo demostramos que diferentes aislamientos y/o cepas de *T. foetus* y *T. vaginalis* contenían 1, 2 ó más de 2 núcleos por parásito en condiciones estándar de crecimiento; lo cual evidenciaba la existencia de una forma alternativa de división celular en estos parásitos. En este contexto, si bien algunos estudios previos habían documentado la existencia de formas multinucleadas en algunos trichomonadidos, la relevancia de este fenómeno no había sido analizada en detalle. Existían informes que mencionaban la presencia de células de mayor tamaño con más de 2 núcleos en *T. foetus*^{97 98}, *T. vaginalis*^{99 100}, *Trichomonas lacerate*⁶⁷, *Gigantomonas herculean*¹⁰¹; así como la existencia de formas gigantes de *Trichomastix serpentis* que podían originar 3 ó 4 células hijas⁶⁷. Además, se había documentado la ocurrencia de mitosis múltiples en material fresco aislado de hospedadores naturales para *Trichomonas muris*, *Trichomonas augusta*, *Tetratrichomonas prowazeki* y *Eutrichomonas serpentis*⁶⁷. Relacionado a esto, se había propuesto previamente la existencia de formas multinucleadas llamadas "pseudoquistes" en *Trichomonas vaginalis*^{63 102}, *Tritrichomonas muris* y *Trichomonas tenax*¹⁰³. Como así también se había detallado que la formación de dichos pseudoquistes era inducida por diferentes tipos de estrés tales como variaciones de la temperatura, tratamientos con ciertas drogas y depleción de hierro en el medio de *T. vaginalis*^{104 105}; o por variación de temperatura, depleción de hierro y productos químicos en *T. foetus*^{106 107}.

La multinuclearidad se ha definido como un proceso relevante en diferentes organismos. La aparición de células multinucleadas en plantas se ha vinculado con un aumento en el tamaño celular y, como resultado, con el crecimiento general del organismo¹⁰⁸. En algunas especies de amebas, las células multinucleadas parecen ser beneficiosas para el crecimiento poblacional¹⁰⁹. En condiciones de crecimiento axénico, los trofozoítos de *E. histolytica* contienen cantidades heterogéneas de ADN debido a la presencia de múltiples núcleos y diferentes cantidades de ADN en cada núcleo; y la formación de células multinucleadas en este organismo se vió que es potenciada por la ausencia de nutrientes. En *Acanthamoeba castellanii*, la multinuclearidad representa una adaptación fisiológica de protozoarios no adherentes que proporciona una ventaja para la proliferación posterior¹⁰⁹. Los parásitos del género *Plasmodium* utilizan la multinucleación en contextos adaptativos muy diferentes. A lo largo de su ciclo de vida, estos parásitos atraviesan regularmente fases poliploides y multinucleadas¹¹⁰. Además, la regulación del número de descendientes también podría estar influenciada por factores extrínsecos del hospedador, y el parásito adapta su capacidad de multiplicación según la presencia de ciertos nutrientes o factores de estrés^{111 112 113}. En este trabajo, demostramos que los parásitos multinucleados están

presentes en condiciones estándar de crecimiento, así como también en condiciones de privación de nutrientes, tanto en *T. foetus* como en *T. vaginalis*. Curiosamente, un bajo porcentaje de estos parásitos multinucleados parecerían ser pseudoquistes (CFW+). Además, observamos que los núcleos de estas células multinucleadas pueden no permanecer sincrónicos durante el proceso de cariocinesis; ya que observamos parásitos con cantidades impares de núcleos (3, 5 y 7 núcleos). Finalmente, revelamos que la depleción de nutrientes genera parásitos únicos poliploides, de los cuales solo un pequeño porcentaje es positivo a la tinción con CFW. En resumen, estos resultados proponen la existencia de nuevas formas de resistencia en estado latente (parásitos poliploides multinucleados o mononucleados), diferentes de los pseudoquistes previamente descritos; cuya formación también se asocia a diferentes condiciones de estrés.

La fisión múltiple se define como un modo de división celular que produce más de 2 células hijas por cada división a través de la “brotación” de la membrana plasmática de una célula madre poliploide o multinucleada ⁶⁷. Algunas algas y protozoos se dividen regularmente mediante el proceso de fisión múltiple ¹¹⁴; en los cuales el núcleo experimenta varias divisiones previas. Después de que las divisiones nucleares se completan, el citoplasma se separa para formar células individuales. En este contexto, algunos autores han descrito a la fisión múltiple como una fase normal de amplia ocurrencia en el ciclo de vida de *Trichomonas augusta* y otros tricomonadidos ⁶⁷. Se sabe que los planos de división celular están dictados por múltiples mecanismos para garantizar una citocinesis exitosa, por lo tanto, el análisis e interpretación del plano de división en todos los organismos es altamente significativo ^{115 116}. En este contexto, hasta este trabajo era ampliamente aceptado que *T. vaginalis* y *T. foetus* se dividían por fisión binaria longitudinal. Sin embargo, la observación frecuente de células multinucleadas con heterogeneidad en los sitios de citocinesis; nos permitió demostrar la existencia de la fisión múltiple como otro posible mecanismo de división celular en estos parásitos. Nuestros resultados también sugieren que dicha fisión múltiple ocurre en diferentes planos: longitudinal, oblicuo y transversal en estos parásitos. Previamente, se había informado que la dirección del plano de división en la fisión binaria en *Tetratrichomonas gallinarum* podía ocurrir en cualquiera de los 3 planos: longitudinal, oblicuo ó transversal ⁶⁷.

Un mecanismo que podría explicar la formación de las células multinucleadas es la endoreplicación del ADN. Durante la endoreplicación, las células llevan a cabo la replicación del ADN en ausencia de una posterior división celular ¹¹⁷. Este proceso puede adoptar diferentes alternativas, tales como endociclos y endomitosis. Sin división celular ó nuclear, el endociclo consiste en fases S-G repetidas de todo el material genético sin que la célula entre en la mitosis ^{118 33}. Esto resulta en un solo núcleo con una ploidía aumentada. En la endomitosis, las células condensan los cromosomas, pero no los segregan en las células hijas. En cambio, vuelven a ingresar a una fase similar a la G1, y la fase S comienza de nuevo: ocurriendo durante la anafase dá como resultado un solo núcleo, y si ocurre durante la telofase resulta en múltiples núcleos dentro de una sola célula ¹¹⁹. El proceso de

endoreplicación se encuentra conservado evolutivamente, y es utilizado como una forma de crecimiento por múltiples tipos celulares durante el desarrollo de muchas especies de plantas y animales ³³. Este es un mecanismo de replicación frecuente en artrópodos y se ha estudiado ampliamente en *D. melanogaster*, en plantas, en peces, en ratones y en humanos, donde algunas células endorepican en respuesta a lesiones o infecciones; mientras que otras lo hacen como parte de un programa de desarrollo ¹²⁰. También se ha observado en una variedad de invertebrados y se vincula frecuentemente con un aumento en el tamaño celular y corporal. Además, la endoreplicación mejora la resistencia de las plantas al estrés ambiental y a la escasez de recursos (en ambientes de alta temperatura o déficit de agua); y algunas plantas utilizan este modo de replicación como una respuesta de supervivencia al daño en el genoma ¹¹⁸. Por otro lado, las células que experimentan endoreplicación en animales desarrollan resistencia al daño del ADN al reducir la expresión de genes pro-apoptóticos ¹¹⁸. La progresión tumoral también está acompañada de endoreplicación y poliploidía, y se sabe que este proceso está asociado con la resistencia a las terapias antitumorales ¹²¹. Los ciclos de endoreplicación en el parásito *E. histolytica* resultan en células con núcleos poliploides ó células multinucleadas. Aquí, demostramos que los parásitos multinucleados de *T. foetus* formados en condiciones de estrés nutricional eran capaces de replicar activamente su ADN. Nuestros resultados demuestran que la endoreplicación puede ocurrir en estos parásitos durante la depleción ó privación de nutrientes como una estrategia alternativa para la poliploidización; lo cual podría ser utilizado por estos parásitos para una multiplicación rápida y eficiente cuando se restablecen las condiciones óptimas (siendo ésta una estrategia eficiente en comparación con la demanda de recursos energéticos que significa la restitución de un núcleo). En conclusión, los múltiples contenidos genómicos presentes en un solo núcleo ó distribuidos en varios núcleos en una sola célula, podrían representar un mecanismo de supervivencia y multiplicación en estos parásitos frente a condiciones ambientales desfavorables.

Finalmente, consideramos que los trichomonadidos podrían representar un sistema modelo interesante para estudiar la endoreplicación del ADN y la poliploidía; así como también sus efectos y posibles ventajas en la respuesta frente al estrés, el desarrollo y las diferentes enfermedades.

INTRODUCCIÓN DEL CAPÍTULO 2

Vía Hippo y sus contrapartes MEN/SIN

El control de la división celular es uno de los procesos celulares fundamentales que involucra una intrincada red de moléculas y vías de señalización. La regulación de este proceso se ve influenciada tanto por factores internos como externos a las células; de hecho, las células sólo se dividen cuando las condiciones nutricionales y ambientales son favorables ¹²².

Una de las vías de señalización mejor estudiadas en el proceso de división celular es la denominada vía Hippo; la cual es una vía de traducción de señales que se encuentra conservada evolutivamente desde la mosca *Drosophila* hasta los humanos ¹²³. En mamíferos, esta vía está integrada por varios componentes claves: las quinasas MST1/2, la proteína homóloga al Salvador 1 (SAV1), las proteínas MOBKL1A/B (MOB1A/B ó *Monopolar spindle One Binder1 A/B*), las quinasas supresoras de tumores grandes 1/2 (LATS1/2), la proteína asociada a Yes 1 (YAP) y la familia de factores de transcripción TEAD ¹²³ (**Fig. 18**).

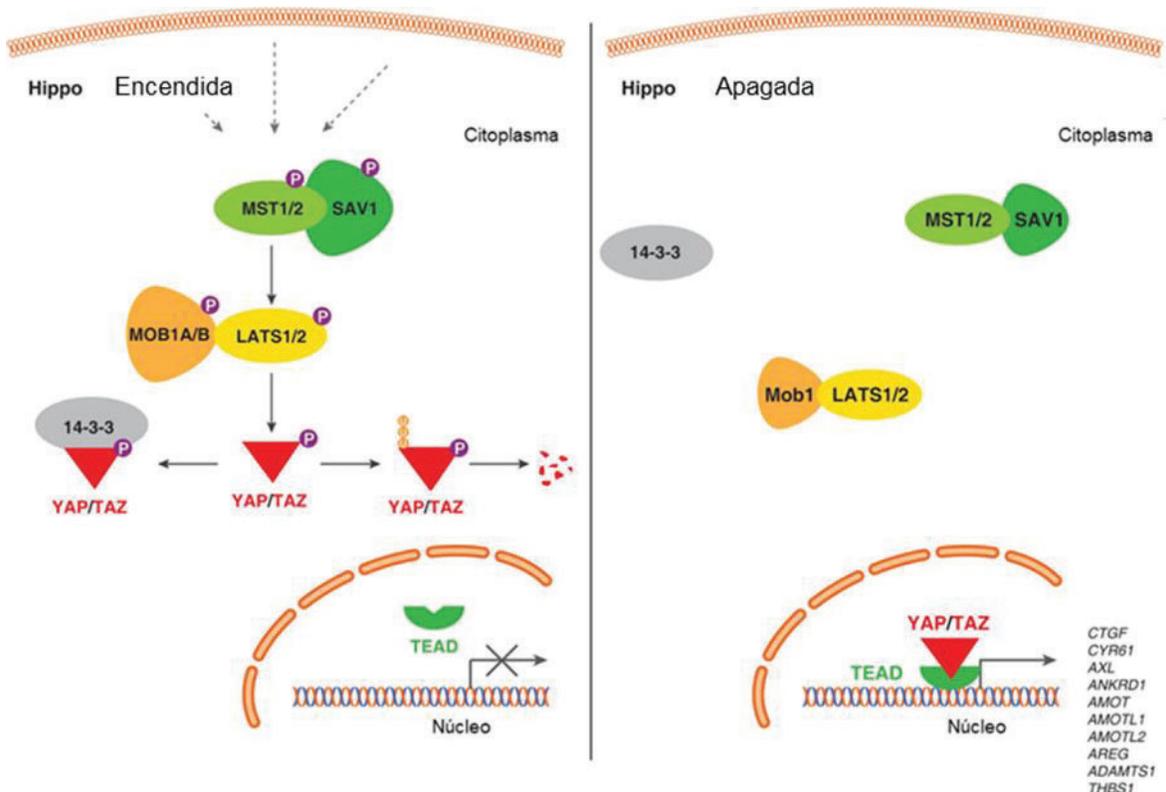


Figura 18: Representación esquemática de la vía de señalización Hippo en células endoteliales humanas. Cuando la vía de señalización Hippo está activa/encendida (**izquierda**), múltiples señales ascendentes regulan la fosforilación de las quinasas MST1/MST2, LATS1/LATS2 y las proteínas YAP/TAZ. La fosforilación de YAP/TAZ recluta proteínas 14-3-3, las cuales estimulan la retención

citoplasmática ó la degradación proteolítica. Cuando la vía de señalización Hippo está inactiva/apagada (**derecha**), YAP/TAZ no se fosforilan, se localizan en el núcleo, forman un complejo con los factores de transcripción TEAD y regulan los genes necesarios para la proliferación, migración y supervivencia de las células endoteliales. Imagen tomada de Boopathy, G. T. K. & Hong, W ¹²⁴.

La proteína YAP actúa como co-activadora de la transcripción al unirse a TEAD1-4, regulando de esta manera la expresión de una amplia gama de genes involucrados en la proliferación celular, la apoptosis y la renovación de las células madres ¹²⁵. Esta vía fue descrita por primera vez en *D. melanogaster* y posteriormente se encontraron sus homólogos en mamíferos. Se ha reportado que desregulaciones en la vía Hippo en *D. melanogaster* generan un crecimiento desmedido de varios tejidos debido a una excesiva proliferación y a una reducida apoptosis. Debido a esto, la vía Hippo ha sido descrita como una vía oncosupresora en estos organismos ^{126 127}. También se ha definido que los componentes de esta vía en *D. melanogaster* son requeridos para una correcta progresión del ciclo celular ^{128 129 130}.

En modelos animales, alteraciones en la vía Hippo inducen un crecimiento celular descontrolado generando una tumorigénesis ^{129 131 127 132 133}. Específicamente, en humanos se ha observado que mutaciones en los genes que codifican para proteínas de esta vía están presentes en algunos tipos de tumores; por lo cual se considera a la vía Hippo como una vía supresora de tumores.

La vía Hippo se activa mediante una serie de eventos de fosforilación. Esta cascada de fosforilación desencadena una serie de respuestas intracelulares que regulan la actividad de factores de transcripción claves (YAP/TAZ) en la regulación del crecimiento y la proliferación celular. En resumen, la proteína MST1/2 estimulada por señales aguas arriba, es fosforilada; y a su vez ésta fosforila a SAV1 y MOB1A/B para contribuir en el reclutamiento de LATS1/2. Rio abajo en esta vía, MST1/2 fosforila a LATS1/2 y ésta fosforila directamente a YAP/TAZ, lo que conduce a la retención o degradación de YAP/TAZ en el citoplasma (**Fig. 18**). El YAP/TAZ inactivado no puede unirse al factor de transcripción TEA que contiene el dominio (TEAD), lo que resulta en un estado de transcripción represivo de TEAD. La inactivación de la vía Hippo ó la degradación de sus componentes permiten la localización nuclear de YAP/TAZ; facilitando su unión a TEAD y activando la transcripción de genes involucrados en la supervivencia de las células tumorales, proliferación, migración, invasión, inmunosupresión, resistencia a fármacos, reprogramación del metabolismo, etc. ^{134 130 133} (**Fig. 18**).

La mayoría de los componentes centrales de la vía Hippo presentan proteínas homólogas en eucariotas unicelulares. En estos organismos, los coactivadores MOB, las quinasas GCKII STE20 y las quinasas NDR han sido principalmente caracterizados en el contexto de las vías MEN (Red de salida de la mitosis en *Saccharomyces cerevisiae*) ó SIN (Iniciación de la septación en *Schizosaccharomyces pombe*) ^{135 136} (**Fig. 19**) (**Tabla 1**). Las vías MEN/SIN

controlan no solo la salida mitótica (progresión desde la anafase hasta la telofase tardía); sino también pueden desempeñar un rol en la regulación de la citocinesis y la abscisión final durante la separación de las células hijas. Tanto las redes MEN como SIN tienen una fosfatasa Cdc14 como proteína efectora; siendo ésta una proteína altamente conservada que está presente también en eucariotas multicelulares.

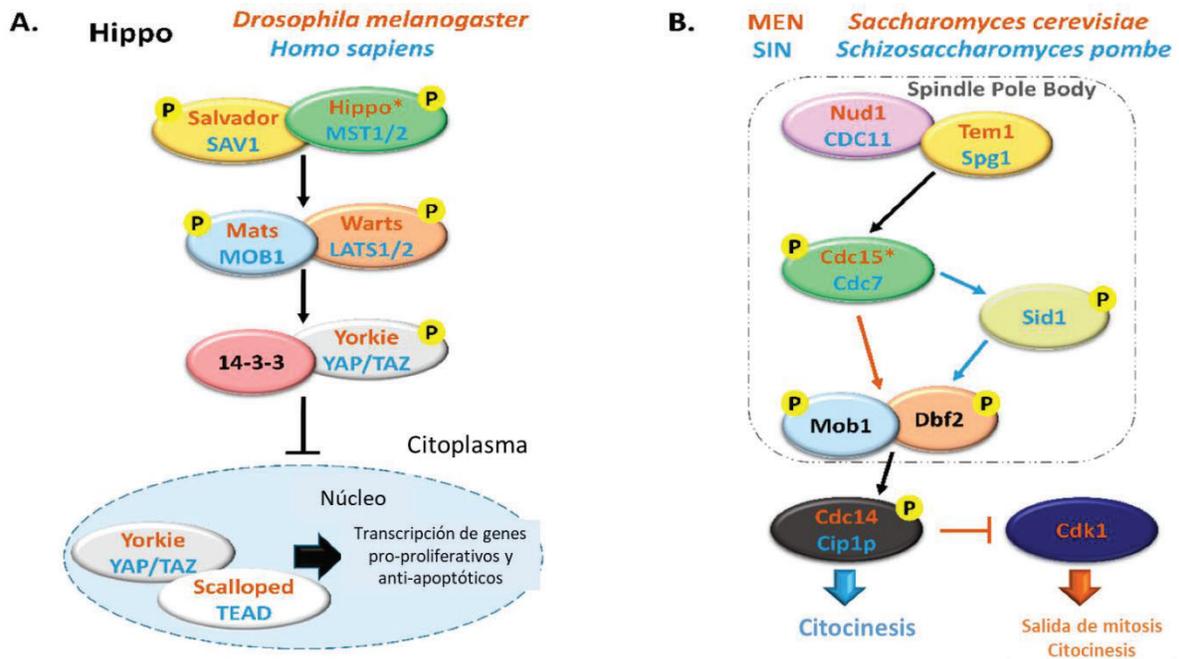


Figura 19: Comparación entre las vías Hippo y MEN/SIN. (A) Representación esquemática de la vía Hippo en *Drosophila melanogaster* (naranja) y en *Homo sapiens* (azul). (B) Representación esquemática de la Red de Salida Mitótica (MEN) en *Saccharomyces cerevisiae* (naranja) y la Red de Iniciación de la Septación (SIN) en *Schizosaccharomyces pombe* (azul). En estas vías, las proteínas ortólogas se representan con óvalos del mismo color (amarillo, Salvador/SAV1/Tem1/Spg1; verde, Hippo/MST1/2/Cdc15/Cdc7; azul, Mats/MOB1/Mob1; naranja, Warts/LATS1/2/Dbf2). Imagen tomada de Delgado y colaboradores¹³⁷.

	<i>S. cerevisiae</i> (MEN)	<i>S. pombe</i> (SIN)	<i>D. melanogaster</i>	Mamíferos
Proteínas quinasas similares a Ste20	Cdc15	Cdc7	Hpo	MST1/2
Proteínas de andamio	Nud1	Complejo Ccd11-Sid4-Ppc89	Sav	SAV1/Furry
Proteína quinasa NDR	Dbf2/20	Sid2	Wts	LAST1/2 o NDR1/2
Proteína adaptadora	Mob1	Mob1	Mats	MOB1A/B
Proteína efectora	Cdc14	Clp1	Yki	YAP/TAZ
Función en mitosis	Salida de la mitosis	Salida de la mitosis y citocinesis	Progresión de la mitosis y citocinesis	Progresión de la mitosis y citocinesis

Tabla 1: Principales proteínas componentes de las vías MEN, SIN e Hippo y sus principales funciones en la mitosis

Puntos de control del ciclo celular y las vías Hippo/MEN/SIN

Las vías MEN/SIN (*Mitotic Exit Network/Septation Initiation Network*) en levaduras y su contraparte en organismos superiores, la vía Hippo, son fundamentales para diversas funciones celulares claves. Estas vías están involucradas en procesos como la salida de la mitosis, la formación del septo (en levaduras) y la regulación del equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis. A su vez, estas vías son parte de una red de señalización

más amplia que coordina eventos claves en el ciclo celular, el desarrollo y la respuesta a señales ambientales. En relación con el control del ciclo celular, estas vías están conectadas con los puntos de control del ciclo celular (*checkpoints*), asegurando que la célula complete cada fase correctamente antes de avanzar al siguiente paso, evitando la proliferación celular descontrolada. En *S. cerevisiae*, por ejemplo, la vía MEN regula las transiciones metafase-anafase y M/G1¹³⁸. La vía SIN en *S. pombe* permite la formación del septo, regulando así el inicio de la citocinesis¹³⁹. Esto permite, una vez que los cromosomas son ensamblados de forma correcta, la transición metafase-anafase mediante una relocalización celular de proteínas componentes de la vía¹³⁵. Por último, la relocalización del complejo Sid2–MOB1 al sitio de división celular promueve la constricción del anillo medio y la septación^{140 141}. En organismos multicelulares como *Drosophila*, la vía Hippo interviene en varios de los puntos de control del ciclo celular. Específicamente, MATS (MOB1 de *Drosophila*) se localiza en los centrosomas durante la mitosis y es necesaria para la correcta segregación de los cromosomas; y también es partícipe necesario para una correcta citocinesis^{142 143}. En los mamíferos se ha demostrado que todos los componentes de la vía Hippo son reguladores de la mitosis. Regulan el punto de control de la ploidía, los controles de la síntesis y daño al ADN, la dinámica de los centrosomas y la mitosis. En la **figura 20** se muestran todos los puntos de control del ciclo celular (*checkpoints*) donde intervienen las proteínas centrales de la vía Hippo.

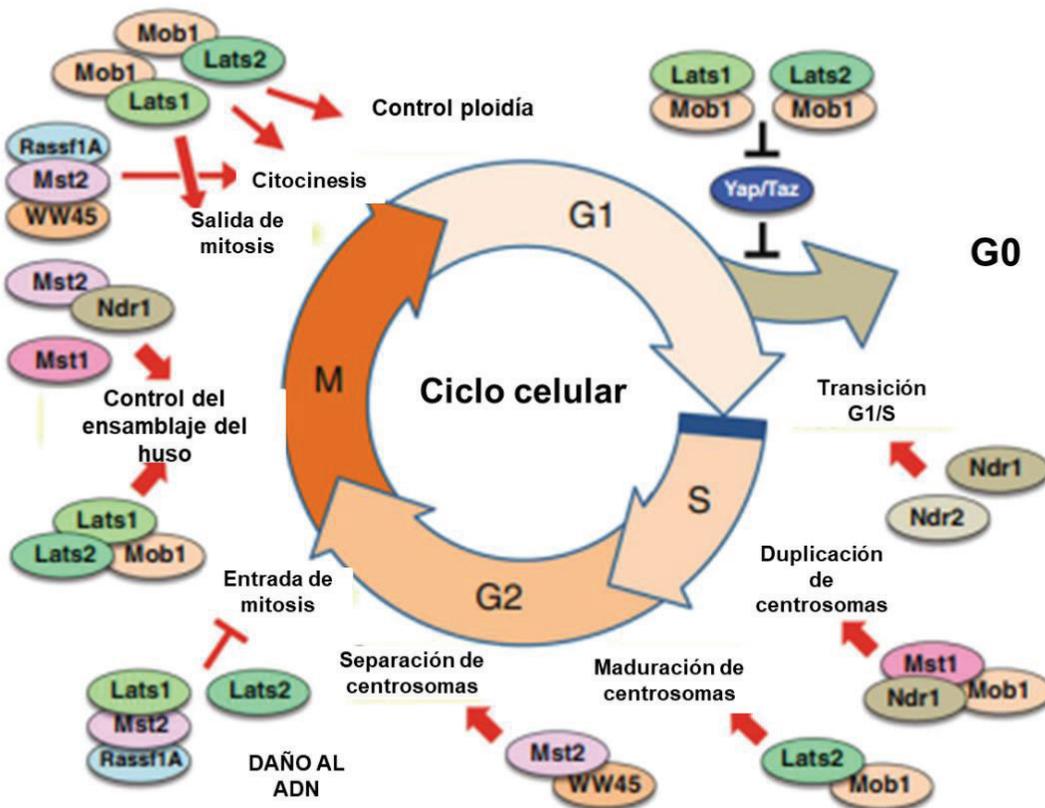


Figura 20: Representación gráfica de los puntos de control presentes en el ciclo celular y su relación con las proteínas claves de la vía Hippo.

Proteínas MOB (Monopolar spindle One Binder)

Entre las proteínas que constituyen las vías de señalización Hippo/MEN/SIN, las proteínas MOB han sido objeto de investigación en animales multicelulares durante más de diez años, evidenciando su función consolidada como mediadores de señales capaces de establecer interacciones con diversas categorías de quinasas. Estas proteínas desempeñan roles fundamentales tanto en la vía de señalización Hippo como en las vías de señalización análogas a Hippo¹⁴⁴. La proteína MOB fue descubierta en *S. cerevisiae* por Luca y Winey en 1998, donde se demostró que la proteína MOB era esencial para mantener los niveles de ploidía y una mitosis exitosa. En este organismo, los autores identificaron dos proteínas MOB: MOB1, la cual era esencial para la supervivencia celular debido a sus funciones mencionadas anteriormente; y MOB2, que no era esencial para la supervivencia, pero estaba involucrada en la asimetría de la brotación durante la reproducción de las levaduras

145

La proteína MOB1 también se demostró que participa en la formación del septo durante el proceso de fisión binaria en la levadura *S. pombe*. En levaduras mutantes de MOB1, las esporas no lograron dividirse, lo que resultó en la formación de células anormales y alargadas^{135 146 147}.

En 2005, Lai y colaboradores demostraron que MOB actuaba como una proteína supresora de tumores en *D. melanogaster*¹²⁹, ya que las mutaciones en este gen condujeron a una proliferación excesiva de células y al desarrollo de tumores en diversos órganos de la mosca. En base a este fenotipo, se denominó a MOB1 como "MATS" (ó "MOB como supresor de tumores")^{127 126 128}. Desde entonces se han identificado genes *Mob* en otras especies; y se han encontrado en números variables en hongos y moscas, donde existen tres ó cuatro genes; mientras que en humanos se han encontrado hasta 7 genes¹⁴⁴.

Las proteínas de la familia MOB están formadas por adaptadores de señales de quinasas y fueron caracterizadas por primera vez como reguladoras del mantenimiento de la ploidía; donde contribuyen a garantizar la segregación adecuada de los cromosomas antes de la salida mitótica; y permitiendo la transición de la mitosis a la citocinesis¹⁴⁵. También se ha reportado que esta familia de proteínas son necesarias para mantener la polaridad y la morfología durante la división celular^{148 149}. En organismos multicelulares, las proteínas MOB han sido principalmente caracterizadas como supresores de tumores y agentes de morfogénesis, frecuentemente regulando las quinasas en la vía Hippo¹⁵⁰.

Vía Hippo y endoreplicación del ADN

La poliploidía es un estado en el que las células poseen más de dos juegos de cromosomas homólogos. Este estado celular puede ser resultado de la fusión celular, ó de divisiones celulares anormales que incluyen endoreplicación, deslizamiento mitótico y fallo en la citocinesis¹⁵¹. La vía de señalización Hippo es un regulador crítico de la auto-renovación de las células madres que dan origen a las células hijas, la regeneración de tejidos y el tamaño de los órganos^{150 152}. Los defectos genéticos que afectan esta vía en ratones pueden provocar un crecimiento desmedido de tejidos y el desarrollo de células tumorales en múltiples órganos^{133 132}. Investigaciones recientes en células de mamíferos, donde el control de la ploidía es estricto, han demostrado una alta activación de la vía Hippo en células poliploides¹⁵³. En hepatocitos una sobreexpresión de YAP, efector río debajo de LATS, aumenta la ploidía de estas células¹⁵³. El trabajo de Zhang y colaboradores proporciona evidencia adicional sobre la importancia de la vía Hippo en la regulación del tamaño nuclear y la ploidía en hepatocitos. Los hepatocitos mutantes para diversos componentes de la vía Hippo exhibieron un aumento en el tamaño de sus núcleos y de la ploidía. Contrariamente, la eliminación de YAP mediante el *knockout* ó delección génica resultó en células con núcleos de menor tamaño y una reducción de la ploidía¹⁵⁴. La conexión entre la vía Hippo y el control de la ploidía también se ha observado en programas de desarrollo donde la endoreplicación desempeña un rol fundamental. Por ejemplo, en

células gigantes del trofoblasto, se ha identificado una relación entre la vía Hippo y la regulación de la ploidía. Estas células gigantes mononucleadas exhiben endociclos, con casi 1000 copias de su ADN genómico; y la formación de estas células mediante endociclos se asocia con una disminución significativa en los niveles de expresión de LATS. La evidencia adicional de que las células que sobreexpresan LATS muestran una disminución en el tamaño de los núcleos y una reducción en el número de células poliploides refuerza la idea de que un aumento en los niveles de LATS previene la formación de endociclos ¹⁵⁵. Estos resultados respaldan la función reguladora de la vía Hippo, particularmente a través de LATS, en el control de la ploidía y el tamaño celular durante procesos de desarrollo que involucran la endoreplicación ¹⁵⁵. En *Drosophila* la reparación de heridas de las células epiteliales de la pared abdominal de un adulto, implica una respuesta específica en el ciclo celular. Por lo general, estas células se encuentran en un estado de reposo, pero ante una injuria, las células epiteliales cercanas a la lesión “reingresan” en el ciclo celular (específicamente en la fase S), sin llevar a cabo la división celular; lo que resulta en un aumento de la ploidía. Este mecanismo de reparación se vio comprometido al inhibir, mediante ARN de interferencia, el factor de transcripción Yorkie (Yki), un componente clave de la vía Hippo. El bloqueo de Yki impidió el reingreso en la fase S de estas células epiteliales en respuesta a la injuria. De manera similar, al sobreexpresar proteínas claves de la vía Hippo en las mismas células, se evidenció una inhibición del reingreso en la fase S; lo que sugiere un rol relevante de la vía Hippo en este proceso de reparación celular en *Drosophila* ^{156 157}.

MOB1 en protozoarios

Además de los estudios realizados en los organismos modelo, también se abordó el análisis de las proteínas MOB1 en diferentes protozoarios. En el parásito extracelular *Trypanosoma brucei* se ha descrito la existencia de dos proteínas MOB1 diferentes: MOB1-A y MOB1-B. Los autores señalaron que, tanto en las formas sanguíneas como las procíclicas de este parásito, la depleción de MOB1 generaba defectos en la citocinesis. En la forma sanguínea, que es la forma infecciosa para mamíferos, la citocinesis se retrasó en la etapa temprana de la incisión del surco. Por otra parte, cuando se afectó la expresión de MOB1 en la forma procíclica también se observó un defecto en citocinesis debido a una posición incorrecta del surco de división ¹⁵⁸. En *Tetrahymena thermophila*, un protozooario unicelular que se divide de manera simétrica, MOB1 se acumula en los cuerpos basales en el polo posterior de la célula; y por lo tanto esta proteína ha sido descrita como el primer marcador de polaridad molecular ¹⁵⁹. En este organismo MOB1 es crucial para la ubicación correcta del plano de división, la finalización de la citocinesis y para mantener las tasas normales de crecimiento de los cilios ¹⁴⁹. Por otra parte, estudios realizados en *Toxoplasma gondii*, organismo unicelular intracelular obligado, demostraron que MOB1 participa en el control de la proliferación celular. Los autores observaron que los niveles de ARNm (ARN mensajero) de MOB1 disminuyeron drásticamente cuando los parásitos se replicaban activamente dentro

de la célula; y que la sobreexpresión de MOB1 condujo a un retraso en la tasa de replicación del parásito ¹⁶⁰. Finalmente, en *T. gondii*, MOB1 también se localiza preferentemente en el polo posterior de la célula, donde se encuentra el complejo basal que es esencial para la citocinesis celular ¹⁶⁰.

Por otro lado, al estudiar la historia evolutiva de la vía Hippo en un grupo diverso de organismos unicelulares que incluye al ciliado *Tetrahymena thermophila*, a la diatomea centrada *Thalassiosira pseudonana*, al alga *Chlamydomonas reinhardtii*, al parásito protozoario *Trichomonas vaginalis* y a la ameba flagelada *Naegleria gruberi*; Se ha llegado a la conclusión de que Mats/MOB1 emerge como el miembro más antiguo de la vía Hippo desde una perspectiva evolutiva, siendo el único miembro presente en organismos unicelulares. A medida que avanzamos en la cadena evolutiva, se observa que su función ha experimentado modificaciones, sugiriendo una adaptación y diversificación de esta proteína a lo largo del tiempo ¹⁶¹.

Teniendo en cuenta la relevancia de las proteínas MOB en el control de la ploidía y del ciclo celular en diversos tipos celulares, nos propusimos como **Objetivo específico 2** de esta tesis, evaluar el rol de la proteína MOB1 en el proceso de división celular de *Tritrichomonas foetus*.

RESULTADOS DEL CAPÍTULO 2

El genoma de *Tritrichomonas foetus* codifica para dos proteínas MOB

Las proteínas MOB se encuentran en todos los eucariotas y están formadas por aproximadamente entre 210 y 240 aminoácidos. Inicialmente, identificamos dos proteínas MOB en el genoma de *T. foetus* (A0A1J4J7F7 y A0A1J4L4G6), a las cuales denominamos MOB1 y MOB2 respectivamente. Luego, con el objetivo de determinar la homología de las proteínas MOB de *T. foetus* (MOB1 y MOB2) con las proteínas MOB de diferentes organismos, realizamos un alineamiento de secuencias. Los porcentajes de identidad que encontramos entre la TfMOB1 y la TfMOB2 fue del 41%. Específicamente, para la comparación de la TfMOB1 con el resto de las secuencias analizadas los porcentajes fueron los siguientes: *T. brucei*: 31.92%, *N. caninum*: 22.80%, *T. gondii*: 23.70%, *E. histolytica*: 31.16%, *G. intestinalis*: 25.12%, *L. donovani*: 33.49%, *S. cerevisiae*: 33.18%, *D. melanogaster*: 37.74%, *B. taurus*: 39.62%, *S. pombe*: 38.46%, *H. sapiens*1A (MOB1A: 40.57%), *H. sapiens*2 (MOB2: 26.67%). Por otro lado, cuando comparamos la TfMOB2 con el resto de las secuencias analizadas los porcentajes fueron: *T. brucei*: 39.17%, *N. caninum*: 22.77%, *T. gondii*: 22.27%, *E. histolytica*: 33.80%, *G. intestinalis*: 24.64%, *L. donovani*: 36.41%, *S. cerevisiae*: 33.18%, *D. melanogaster*: 43.06%, *B. taurus*: 45.37%, *S. pombe*: 40.28%, *H. sapiens*1A (MOB1A: 44.91%), *H. sapiens*2 (MOB2: 29.17%) (**Fig. 21**).

<i>T.foetus</i> (MOB1)	1	-----MMRSH---NSDTFR-----	-----VLPAPN	17
<i>T.foetus</i> (MOB2)	1	MSAIKK-----FFGKN---SGSKTFK-----	-----VHKKVPK	25
<i>T.gondii</i>	1	MNYWTSWRLPRPCARKAPLQGGAAIR	-----PKKASHA	33
<i>T.brucei</i>	1	MK-----RFKAKLFDSDRTYK	-----PKKKHKE	23
<i>N.caninum</i>	1	MD-----	-----RKKPPM	8
<i>L.donovani</i>	1	MK-----LFGSSLFDSDKTYR	-----PKKKHKE	23
<i>G.intestinalis</i>				
<i>E.histolytica</i>	1	-----MFGRK---KIVTMK-----	-----PIKKLPH	18
<i>D.melanogaster</i>	1	MDF-----LFGSR---SSKTFK-----	-----PKKN IPE	21
<i>S.pombe</i>	1	MF-----GFSNK---TAKTFR-----	-----VRKTEA	19
<i>S.cerevisiae</i>	1	MSFLQNPHI SPGQTI R---STRGFKWNTANAANNAGSVSPSTKATPHNNT INGNNNNANT INNRADF TNNPVNGYNE SDHGRMSPVLTTPPKRHAPP	92	
<i>B.taurus</i>	1	MSF-----LFGSR---SSKTFK-----	-----PKKN IPE	21
<i>H.sapiens</i> (MOB1A)	1	MSF-----LFGSR---SSKTFK-----	-----PKKN IPE	21
<i>H.sapiens</i> (MOB2)	1	MDW-----LMGKS---KAKPNG-----	-----KKPAEA	20
<i>T.foetus</i> (MOB1)	18	N-----	-----	61
<i>T.foetus</i> (MOB2)	26	G-----	-----	69
<i>T.gondii</i>	34	R-----	-----	101
<i>T.brucei</i>	24	G-----	-----	67
<i>N.caninum</i>	9	Y-----	-----	42
<i>L.donovani</i>	24	G-----	-----	67
<i>G.intestinalis</i>	1	-----	-----	42
<i>E.histolytica</i>	19	G-----	-----	62
<i>D.melanogaster</i>	22	G-----	-----	65
<i>S.pombe</i>	20	G-----	-----	63
<i>S.cerevisiae</i>	93	PEQLQNVTDNYTSPHQKFLPQQAGTTV	165	
<i>B.taurus</i>	22	G-----	-----	65
<i>H.sapiens</i> (MOB1A)	22	G-----	-----	65
<i>H.sapiens</i> (MOB2)	21	E-----	-----	64
<i>T.foetus</i> (MOB1)	62	NQCVLLYTPISKYCTDHRCPENTAGPQYQYFW	139	
<i>T.foetus</i> (MOB2)	70	NEITMVTEDVLHFCIDKCPNMCAGTKYQYLW	148	
<i>T.gondii</i>	102	NEVQLVWLVKDKCQ---CRGFTAGEH---	171	
<i>T.brucei</i>	68	NIINVLVYGSLLTEFCNTSSCPVMSSGPRYELW	146	
<i>N.caninum</i>	43	NEVQLVWVFKDKCQ---CRGFTAGEQ---	112	
<i>L.donovani</i>	68	NIINVLVYGSLLTDYCDMSCPVMSSGPRYELW	146	
<i>G.intestinalis</i>	43	KHTKRLSAITSSFCSTNTPSMSISETQDVI CVVETDEGN CDDLDSSDMSAPAHKNGRSM	138	
<i>E.histolytica</i>	63	NEINLTYSSITALTCTTRCPVMNAGPKMEYVW	138	
<i>D.melanogaster</i>	66	NIINMLYGTITEFCTEETCGIMSAGPKYEHV	144	
<i>S.pombe</i>	64	TIINMLYGTITEFCCTAASCQPMNAGPSYEEYV	142	
<i>S.cerevisiae</i>	166	NIINMLYGTITEFCSPQTCPRMIATNEYEYLW	243	
<i>B.taurus</i>	66	NIINMLYGTITDFCTEESCQPMNAGPKYEHV	144	
<i>H.sapiens</i> (MOB1A)	66	NIINMLYGTITEFCCTEASCQPMNAGPRYEHV	144	
<i>H.sapiens</i> (MOB2)	65	HHINLQYSTISEFCGETCQTMAVCNT-QYYW	140	
<i>T.foetus</i> (MOB1)	140	EIVIRNIFKLLRVYAH IYVHSDDMRQDDLASLNTSFRHFVTFSD	210	
<i>T.foetus</i> (MOB2)	149	KDIIKQICKRLLRVYAH LYVHLLDDIRKLEIEAHFNFAFRHFYTFINEFKLVPSNELEPLNQ IIESFSKKN	219	
<i>T.gondii</i>	172	SQHVSI LAQLMH IYCH IYRQHFYLVETDTVAYVNCCKFHALLFGNEFHLITDADVAAVANLVKIFLQQAQSEQHRSCNATNWTSLLEGCGSGRD	266	
<i>T.brucei</i>	147	ADRVKACFKRLLRVYAHVYVYSHFAK IRELQEEESHINTALKHFMFYVWF	225	
<i>N.caninum</i>	113	PQHVSFILSGLMYYVCH IYRQHFYLVETDTVAYVNCCKFHALLFGD	207	
<i>L.donovani</i>	147	KSYVKNIFRRMFRVYAH IYVYSHFTK IAELEQEEAHMNTAFKHFMYFAWE	223	
<i>G.intestinalis</i>	139	KNRCHMLRLLH IYFVYFNHFGI VFR-HFLLLYNTSFRYVMEVFGVRYDILRDADLLPMAAAINHWSMA	208	
<i>E.histolytica</i>	139	AETVRKIKRLLRVYAHMFYHMEHLEGLIQGIALRGFKHFYAFRCRQYKMLGKEDVVP LHSLVLEDLDFEFGKSL	214	
<i>D.melanogaster</i>	145	HSSAKTILKRLFRVYAH IYHQHFTFVVTLGEEAHLNLSFKHFIFFVQEFNLIERRELAPLOELIDKLTAKDRQ I	219	
<i>S.pombe</i>	143	RKVIQIIRRLFRVYAH IYCSHFHVMVAMELESYLNTSFKHFIFFVQEFNLMNDKIEYAPMDLVDSMV	210	
<i>S.cerevisiae</i>	244	IQRVIQIIRRLFRVYAH IYCHFNELLENLQTVLNTSFRHFCLFAQEFELLRPADFGP LLELVMLDRD	314	
<i>B.taurus</i>	145	MSVAKTILKRLFRVYAH IYHQHFDVPIQLQEEAHLNLSFKHFIFFVQEFNLIDRRELAPLOELIEKLTSKDR	216	
<i>H.sapiens</i> (MOB1A)	145	MSVAKTILKRLFRVYAH IYHQHFDVPMQLQEEAHLNLSFKHFIFFVQEFNLIDRRELAPLOELIEKLGSKDR	216	
<i>H.sapiens</i> (MOB2)	141	ESLVRKICRHLFHVLAH IYVAHFKE TLALALELHGHNLTLVYHFI LFAREFNLDPDKETAIMDDLTEVLCSGAGGVHSGSGDAGSGGPGAQNHVK	235	
<i>T.foetus</i> (MOB1)				
<i>T.foetus</i> (MOB2)				
<i>T.gondii</i>	267	RDPK-CSLSPYHSNMCREKEELLVPESQTTTSADGRSDKSPRSSQAS	313	
<i>T.brucei</i>				
<i>N.caninum</i>	208	RNPKGASLPPYHSNMCREKGLLGPESQTTCT-DGHSDKSPRNSQAS	254	
<i>L.donovani</i>				
<i>G.intestinalis</i>				
<i>E.histolytica</i>				
<i>D.melanogaster</i>				
<i>S.pombe</i>				
<i>S.cerevisiae</i>				
<i>B.taurus</i>				
<i>H.sapiens</i> (MOB1A)				
<i>H.sapiens</i> (MOB2)	236	ER-----	-----	237

Figura 21: Alineamiento múltiple entre las proteínas MOB de *T. foetus* y MOB de referencia en otros organismos. *T. foetus* (*Tritrichomonas foetus*) MOB1(A0A1J4J7F7). *T. foetus* (*Tritrichomonas foetus*) MOB2 (A0A1J4L4G6). *T. brucei* (*Trypanosoma brucei*) (Q95UM8), *N. caninum* (*Neospora caninum*), *T. gondii* (*Toxoplasma gondii*) (A0A139Y0H6), *E. histolytica* (*Entamoeba histolytica*) (C4M947), *G. intestinalis* (*Giardia intestinalis*) (V6TLD7), *L. donovani* (*Leishmania donovani*) (A0A3S5H5T5), *S. cerevisiae* (*Saccharomyces cerevisiae*) (P40484), *D. melanogaster* (*Drosophila melanogaster*) (Q95RA8), *B. taurus* (*Bos taurus*) (A0A3Q1MBK1), *S. pombe* (*Schizosaccharomyces pombe*) (O94360), *H. sapiens*1A (*Homo sapiens*) (MOB1A,Q9H8S9), *H. sapiens*2 (*Homo sapiens*) (MOB2,Q70IA6). Aquellos aminoácidos con propiedades fisicoquímicas similares se encuentran

coloreados de manera idéntica: hidrofóbicos (rosa), aromáticos (marrón), positivos (lila), negativos (rojo), hidrofílicos (verde), conformacionales (fucsia) y cisteína (amarillo). Se marcaron sólo los aminoácidos que superan el 20% de conservación.

La proteína TfMOB1 presenta localización nuclear y citosólica; mientras que TfMOB2 se localiza únicamente en el citosol

La proteína MOB tiene un rol fundamental en el proceso de división celular en *S. cerevisiae*, *S. pombe* y en mamíferos; ya que participa en el control de las vías MEN, SIN e Hippo, respectivamente^{145 147 129}. En este contexto, nos propusimos caracterizar a las proteínas MOB1 y MOB2 de *T. foetus*, analizando inicialmente sus localizaciones subcelulares en parásitos que sobreexpresaban ambas proteínas. Para esto, parásitos *T. foetus* de la cepa K fueron transfectados con el vector de expresión MasterNeo que contenía una etiqueta de hemaglutinina, y al que le insertamos los marcos abiertos de lectura de los genes que codifican para la TfMOB1 y para la TfMOB2, independientemente (denominados TfMOB1FL y TfMOB2FL, respectivamente). Como control, se transfectaron parásitos con el vector vacío (TfEpNeo)⁵⁸. Posteriormente, determinamos la eficiencia de transfección y/o sobreexpresión, mediante un ensayo de Western blot utilizando un anticuerpo anti-HA. En la **Fig. 22A** podemos observar en el lisado proteico total de parásitos TfMOB1FL una banda de peso molecular de 25 kDa, la cual coincide con el tamaño esperado de TfMOB1. Observamos también una banda del mismo peso molecular esperado, cuando analizamos el lisado de parásitos TfMOB2FL.

A continuación, llevamos a cabo la evaluación de la localización subcelular de las proteínas TfMOB1FL y TfMOB2FL mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo primario anti-HA. Observamos que TfMOB1FL presentaba una distribución nuclear y citosólica en estos parásitos; siendo la marca nuclear mucho más intensa que la citoplasmática (**Fig. 22B**). Para validar la localización subcelular de TfMOB1, utilizamos un anticuerpo generado específicamente contra la proteína MOB1 (anti-MsMOB1) de *Medicago sativa* (alfalfa); el cual nos fue cedido por la Dra Citterio del Departamento de Ciencias del ambiente y territorio, de la Universidad de Milano-Biocca⁵⁷. Cabe destacar que este anticuerpo había sido capaz de reconocer específicamente la proteína MOB1 en otras plantas y en células de animales⁵⁷. Para evaluar si dicho anticuerpo reconocía la proteína MOB1 de *T. foetus*, realizamos una inmunofluorescencia indirecta co-localizando TfMOB1 endógena y TfMOB1FL-HA. Los resultados revelaron que tanto la proteína TfMOB1 endógena como la TfMOB1FL presentaban similar distribución intracelular: una fuerte marca nuclear y una señal menos intensa en el citoplasma (**Fig. 22B**).

En cambio, la proteína TfMOB2FL mostró una localización únicamente citoplasmática. En la **Figura 22C**, podemos observar que tanto en células que no están en división como en aquellas que sí, la proteína siempre se localizó en el citoplasma. Considerando la localización subcelular de ambas proteínas, los resultados sugieren que la proteína TfMOB1

al presentar localización nuclear, podría tener alguna participación en la regulación del proceso de división celular. En este contexto, se ha descrito que en los organismos que se dividen por mitosis cerrada, las proteínas involucradas en la división celular ingresan al núcleo mediante los poros nucleares ¹⁶². Teniendo en cuenta lo antes expuesto y que el objetivo de esta tesis era caracterizar el proceso de división celular de *T. foetus*, decidimos seguir analizando únicamente el rol de TfMOB1 en el resto de la tesis.

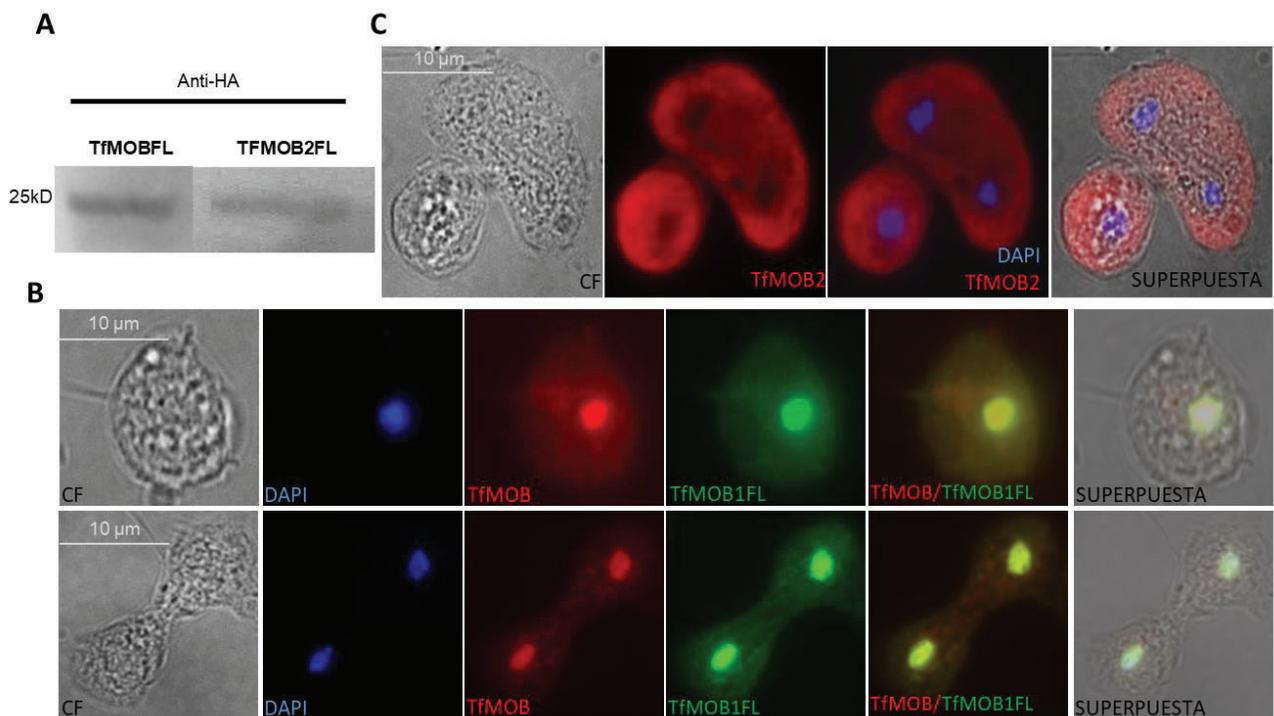


Figura 22: Localización celular de las proteínas TfMOB1 y TfMOB2. (A) Western blot de extractos proteicos totales de TfMOB1FL y TfMOB2FL utilizando el anticuerpo anti-HA. (B) Inmunofluorescencia indirecta de parásitos TfMOB1FL utilizando un anticuerpo anti-MsMOB1 (rojo), anti-HA (verde). DAPI (azul). CF, imagen de contraste de fase. Barra de escala, 10 µm. (C) Inmunofluorescencia indirecta de parásitos TfMOB2FL utilizando un anticuerpo anti-HA (rojo). DAPI (azul). CF, imagen de contraste de fase. Barra de escala, 10 µm.

Los resultados obtenidos por inmunofluorescencia sugieren que el anticuerpo anti-MsMOB1 estaría reconociendo la proteína endógena MOB1 de *T. foetus* (Fig. 22B). Para constatar la especificidad del anticuerpo anti-MsMOB1, realizamos un Western blot utilizando un extracto proteico total de *T. foetus* y el anticuerpo primario anti-MsMOB1. Como se puede observar en la Figura 23A, el anticuerpo reconoce una única banda

correspondiente a un peso molecular de aproximadamente 25 kDa. Para confirmar los resultados obtenidos utilizando una técnica con mayor resolución, realizamos una inmunomicroscopía electrónica utilizando el anticuerpo anti-MsMOB1, y demostramos que dicho anticuerpo reconoció una proteína MOB de localización nuclear y citosólica en parásitos *T. foetus* salvajes de la cepa K (**Fig. 23B**). Si bien no podemos descartar con nuestros ensayos que el anticuerpo anti-MsMOB1 pueda reconocer a la TfMOB2, la localización dual (nuclear y citosólica) coincide con lo observado en los parásitos TfMOB1FL; por ende, este resultado nos estaría sugiriendo que el anticuerpo anti-MsMOB1 es capaz de reconocer a la proteína MOB1 de *T. foetus*.

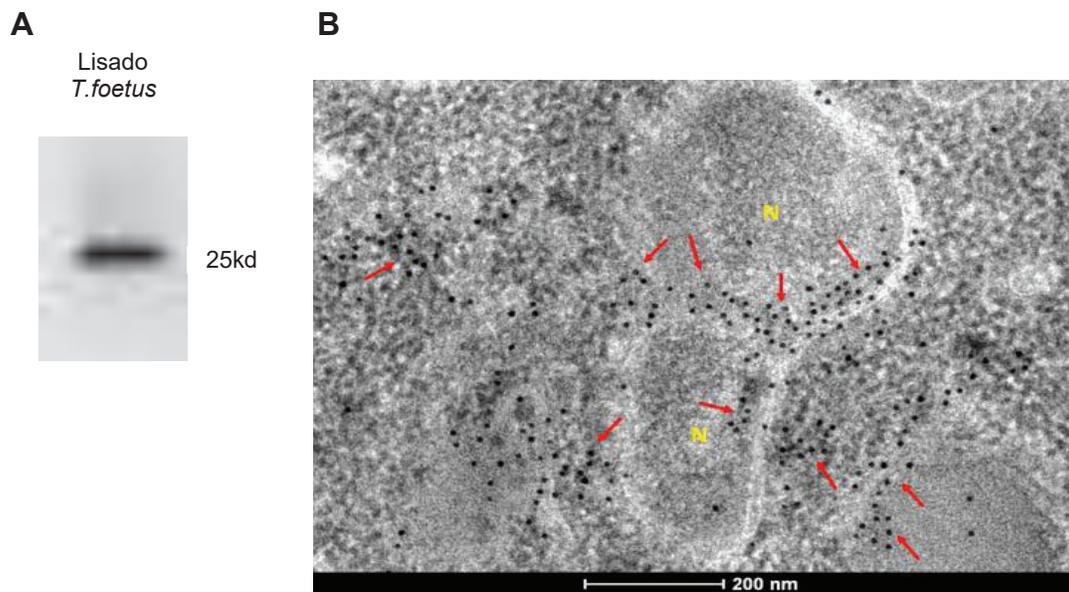


Figura 23: Localización subcelular de TfMOB. (A) Western blot de un extracto proteico total de *T. foetus* utilizando el anticuerpo anti-MsMOB1. (B) Inmunomicroscopía electrónica de parásitos *T. foetus* realizada con el anticuerpo anti-MsMOB1, donde puede observarse la distribución nuclear y citosólica de la proteína TfMOB reconocida por el anticuerpo utilizado (flechas rojas). N: núcleo.

La expresión y la localización subcelular de TfMOB1 varían durante el ciclo celular de *T. foetus*

Considerando reportes previos sobre el rol de la proteína MOB en el ciclo celular de diferentes organismos; nos propusimos analizar la posible relación de la TfMOB1 con el ciclo celular de este protozoario ^{163 128 158 164 143}. Para esto, analizamos el nivel de expresión del gen *Tfmob1* mediante PCR en tiempo real (qPCR) a lo largo de las distintas fases del ciclo celular. Se analizaron tres grupos de parásitos: parásitos sincronizados y arrestados en G1

(obtenidos mediante incubación durante 18 horas sin suero); así como también dos grupos de parásitos que se encontraban en las fases G2/M (obtenidos mediante incubación sin suero durante 18 horas y posterior reactivación del ciclo celular por agregado de suero e incubación posterior durante 3 horas y 5 horas)⁶⁵. Como control, se determinó mediante citometría de flujo la fase del ciclo celular en la que se encontraba cada población. El análisis de los resultados de la citometría confirmó que los parásitos incubados durante 18 horas sin suero estaban arrestados en la fase G1; mientras que los parásitos a los que se les restableció el medio TYM complementado con suero durante 3 horas y 5 horas, se encontraban mayoritariamente en las fases G2-M (**Fig. 23A**). La PCR en tiempo real reveló que cuando los parásitos estaban detenidos en la fase G1, los niveles de expresión del gen *Tfmob1* eran bajos al compararlos con los niveles observados en los parásitos que se encontraban mayoritariamente en las fases G2-M (18 hs sin suero + 5 hs de medio con suero) (**Fig. 23B**). Los resultados obtenidos sugieren que los niveles de expresión del gen *Tfmob1*, si bien aumentaron en las fases G2-M, en general se mantienen bajos durante la progresión normal del ciclo celular en *T. foetus*.

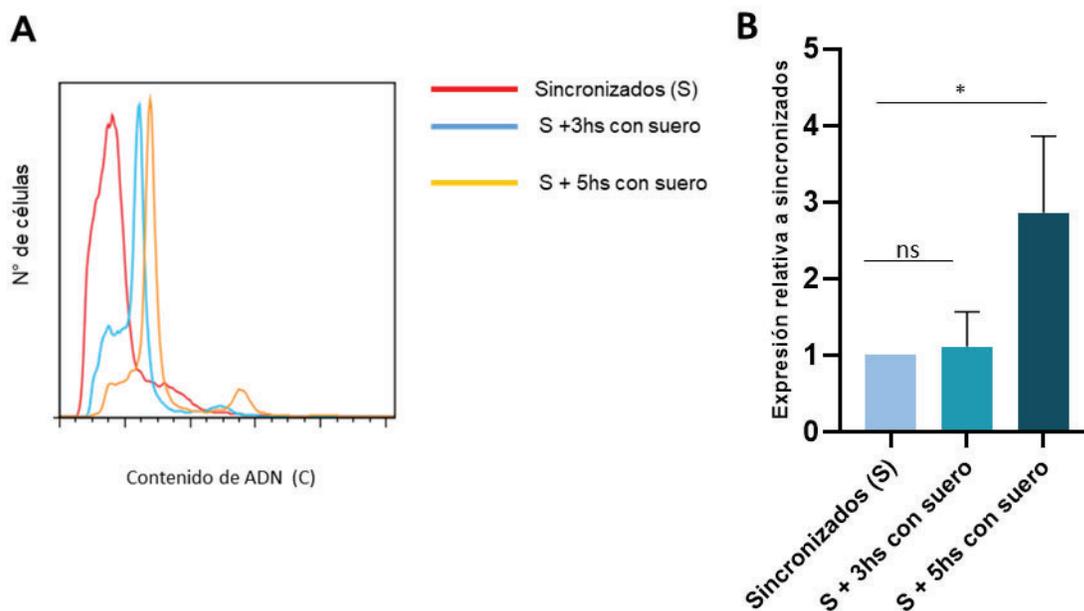


Figura 23: Caracterización de la proteína MOB1 durante el ciclo celular de *T. foetus*. Parásitos incubados durante 18 horas sin suero (Tiempo 0) e incubados sin suero durante 18 horas; a los cuales posteriormente se les restableció el suero durante períodos de 3 horas y 5 horas (Tiempo 3 y 5 respectivamente). **(A)** Imagen representativa del contenido de ADN de cada una de las poblaciones de parásitos analizados. **(B)** PCR en tiempo real de las distintas poblaciones de parásitos. Las barras representan el promedio de la expresión en cada uno de los tratamientos relativizados al tiempo 0.

Luego, teniendo en cuenta los cambios de expresión de *Tfmob1* a lo largo del ciclo celular, decidimos evaluar si estos cambios de expresión se acompañaban de cambios en su localización subcelular. Con este objetivo, realizamos una inmunofluorescencia indirecta de parásitos en las diferentes fases del ciclo celular (G1 y G2-M). Los parásitos incubados durante 18 horas sin suero (tiempo 0), parásitos incubados durante 18 horas sin suero a los cuales se les agregó suero y luego se los incubó durante 3 horas y 5 horas; fueron fijados e incubados con el anticuerpo anti-MsMOB1. Como se observa en la **Fig. 24**, la proteína TfMOB1 mostró una distribución diferente dependiendo si los parásitos estaban en G1 (tiempo 0) ó en G2-M (tiempos de 3hs y 5hs). En el tiempo 0 se observó una marca más intensa en el núcleo de los parásitos, al compararlos con los tiempos de 3 hs y 5 hs. En los tiempos de incubación de 3hs y a las 5hs, la marca se distribuyó de manera homogénea en toda la célula (núcleo y citoplasma). Este patrón concuerda con observaciones reportadas en otros organismos, donde la localización de la proteína es dinámica y depende de las fases del ciclo celular ^{165 166 142 57}. En resumen, los resultados obtenidos estarían sugiriendo un posible rol de la proteína MOB1 en el ciclo celular de *T. foetus*.

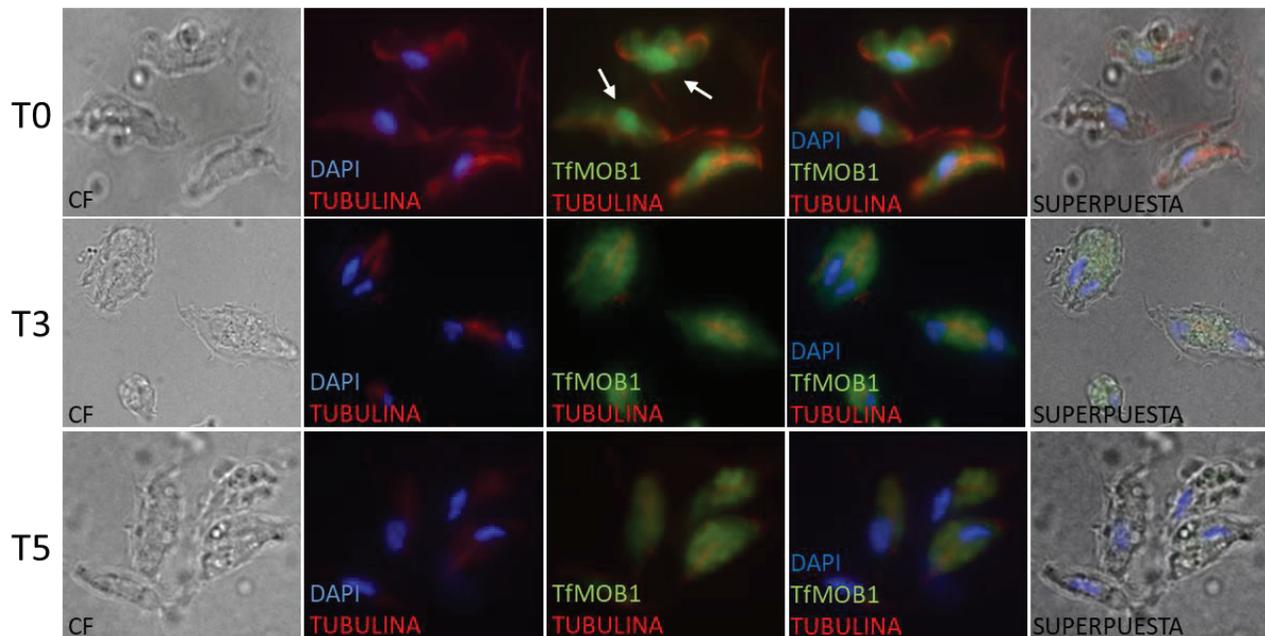


Figura 24: Caracterización de la proteína MOB1 durante el ciclo celular de *T. foetus*. Parásitos incubados durante 18 horas sin suero (Tiempo 0) e incubados sin suero durante 18 horas a los cuales posteriormente se les restableció el suero durante períodos de 3 horas y 5 horas (Tiempo 3 y 5 respectivamente). En la figura se observa la inmunofluorescencia de las distintas poblaciones de parásitos T0 (tiempo 0), T3 (tiempo 3hs) y T5 (tiempo 5hs), en la cual se utilizó un anticuerpo anti-MsMOB1 (verde) y anti- α tubulina (rojo). CF, imagen de contraste de fase. Los núcleos se marcaron con DAPI. Las flechas blancas indican la marca nuclear predominante de TfMOB1 en parásitos al T0.

El gen *Tfmob1* presenta una expresión diferencial en condiciones de estrés nutricional

Teniendo en cuenta la incidencia del estrés nutricional en la división celular de *T. foetus* nos propusimos analizar los niveles de expresión de *Tfmob1* en parásitos incubados en condiciones de estrés nutricional. Planteamos dos condiciones de estrés nutricional: a) parásitos incubados durante 48 horas en medio de cultivo estándar sin suero (estrés moderado) y b) y parásitos incubados durante 48 horas en un medio de cultivo sin maltosa (restricción de carbohidratos); considerando a esta última condición como un tipo de estrés nutricional más severo. Como control, se incubaron parásitos en condiciones estándar de cultivo. El análisis de qPCR evidenció una disminución en la expresión del gen cuando los parásitos se encontraban en condiciones de estrés nutricional (**Fig. 25**). Los resultados obtenidos demuestran una disminución significativa de aproximadamente 7 y 20 veces en la expresión del gen cuando los parásitos fueron incubados en medio TYM sin suero y maltosa, respectivamente; en comparación con la expresión de este gen en parásitos cultivados en medio TYM con suero.

Si consideramos que los niveles de expresión de *Tfmob1* aumentan cuando los parásitos se encuentran en las fases G2-M (**Fig. 23B**), y que los valores disminuyen cuando los parásitos se encuentran en condiciones de estrés nutricional (leve y moderado); estos resultados nos estarían sugiriendo un rol de esta proteína en la proliferación de estos parásitos.

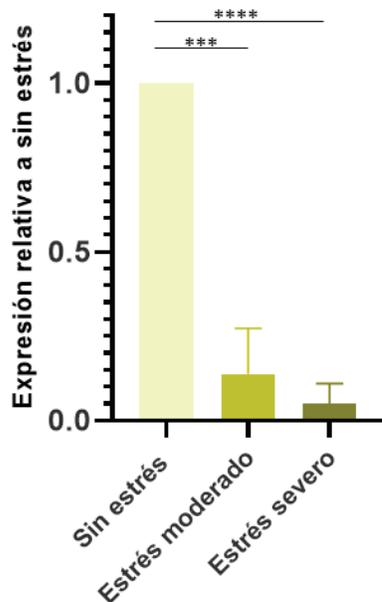


Figura 25: Análisis de la expresión del gen que codifica para la proteína TfMOB1 en parásitos incubados en condiciones de estrés nutricional. Las barras representan el promedio de la expresión relativa del gen *Tfmob1* en parásitos incubados en medio TYM sin suero (estrés moderado), y en medio TYM sin maltosa (estrés severo). Los datos se relativizaron respecto a la expresión del mismo gen en parásitos incubados en medio TYM suplementado con suero (sin estrés). Los datos corresponden a tres ensayos independientes y la barra de error representa el desvío estándar. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante comparaciones de a pares con el control con el Test de Tuckey, con $p < 0,005$.

Las proteínas TfMOB1FL y TfMOB1ΔNt se localizan en el núcleo y en el citoplasma

En otros organismos se ha demostrado que las proteínas MOB poseen una estructura alfa-hélice en su extremo N-terminal con dos residuos fosforilables (12 y 35) y que la fosforilación de estos residuos es clave para regular su función^{167 168}. Específicamente, mutaciones en el N-terminal de ScMob1 (*S. cerevisiae*) arrestan a las levaduras en los estadios finales de la mitosis e inhiben la interacción con la quinasa Dbf2p (LAST1 en mamíferos)¹⁶⁸. Acorde a lo expuesto, utilizamos el predictor *GPS 3.0 kinase-specific Phosphorylation Site Prediction*, para determinar los residuos fosforilables de la secuencia N-terminal de TfMOB1. Mediante el análisis bioinformático pudimos determinar que los sitios 9 y 31 son los únicos putativamente fosforilables dentro del extremo N-terminal de esta proteína. Por ende, nos propusimos evaluar si la delección de un fragmento del N-terminal (conteniendo estos dos sitios putativos de fosforilación) de la proteína MOB1; tenía alguna implicancia funcional en estos parásitos. Generamos entonces una población de parásitos sobreexpresando esta versión truncada de la TfMOB1, a la que denominamos TfMOB1ΔNt. En resumen, para realizar experimentos de ganancia de función que nos permitan evaluar la función de MOB1 en el proceso de división celular obtuvimos tres poblaciones de parásitos transfectados: TfEpNeo, TfMOB1FL y TfMOB1ΔNt. Como control, para demostrar la sobreexpresión de cada una de las proteínas realizamos una evaluación por Western blot utilizando un anticuerpo anti-HA. En los parásitos TfMOB1ΔNt observamos una banda acorde al peso molecular esperado teniendo en cuenta la delección del extremo N-terminal (21.5 kD) (**Fig. 26A**). A continuación, llevamos a cabo la evaluación de la localización subcelular de la proteína TfMOB1ΔNt mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo primario anti-HA. Observamos que TfMOB1ΔNt presentaba una distribución tanto en el citoplasma como en el núcleo de estos parásitos, siendo la marca nuclear mucho más intensa, corroborando que la delección de N-terminal no modifica la localización celular de la proteína (**Fig. 26B**).

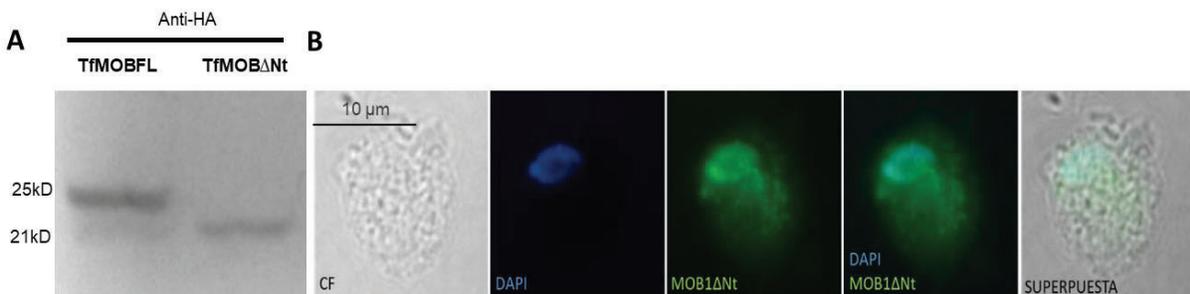


Figura 26: Evaluación de la localización subcelular de TfMOB1ΔNt: (A) Western blot de extractos proteicos totales de TfMOB1FL y TfMOB1ΔNt utilizando el anticuerpo anti-HA. **(B)**

Inmunofluorescencia indirecta de parásitos TfMOB1 Δ Nt utilizando un anticuerpo anti-HA (verde). DAPI (azul). CF, imagen de contraste de fase. Barra de escala, 10 μ m.

La sobreexpresión de la proteína TfMOB1FL afecta el crecimiento de *T. foetus*

Para evaluar el rol de MOB1 durante el proceso de división celular, evaluamos el efecto de la sobreexpresión de TfMOB1FL y TfMOB1 Δ Nt en el crecimiento de los parásitos. Teniendo en cuenta que el crecimiento de *T. foetus* se ve influenciado por la concentración de nutrientes presente en el medio de cultivo; examinamos la cinética de crecimiento realizando el recambio del medio de cultivo cada 24 horas. Por ende, si se presentaban diferencias en el crecimiento de los parásitos TfMOB1FL ó TfMOB1 Δ Nt; este efecto se debería a la sobreexpresión y no a la falta de nutrientes. En la **Figura 27A**, podemos observar que los parásitos TfMOB1FL, pero no así los parásitos TfMOB1 Δ Nt, mostraron un retraso en el crecimiento al compararlos con aquellos parásitos control TfEpNeo. Estos resultados nos sugieren un posible rol de la proteína TfMOB1 en la regulación del crecimiento del parásito *T. foetus*.

Para evaluar si esta proteína pudiese estar afectando el proceso de división; evaluamos el contenido de núcleos de los parásitos sobreexpresantes. Para esto, los núcleos de las diferentes poblaciones de parásitos (TfEpNeo, TfMOB1FL y TfMOB1 Δ Nt) fueron teñidos con DAPI y las imágenes fueron analizadas mediante microscopía de epifluorescencia. Determinamos el porcentaje de parásitos que se encontraban en proceso de división; considerando parásitos en división a aquellos que presentaban dos ó más núcleos. La **Figura 27B** nos muestra que las poblaciones de parásitos TfMOB1FL ó TfMOB1 Δ Nt presentaron un porcentaje significativamente mayor de parásitos en proceso de división, en comparación con el control (TfEpNeo). Los parásitos TfMOB1FL mostraron un 39,3 % de parásitos en división; mientras que los parásitos TfEpNeo tuvieron un 17,3% de parásitos en división. Por su parte, los parásitos TfMOB1 Δ Nt mostraron un valor intermedio de 29,7%. Estos resultados nos sugieren que el retraso en el crecimiento de TfMOB1FL podría deberse a una alteración/retraso en el proceso de separación de las células hijas (citocinesis); y que los parásitos TfMOB1 Δ Nt si bien mostraron un porcentaje intermedio de células en división, pudieron resolver de manera más eficiente la división celular final; no viéndose afectada su curva de crecimiento.

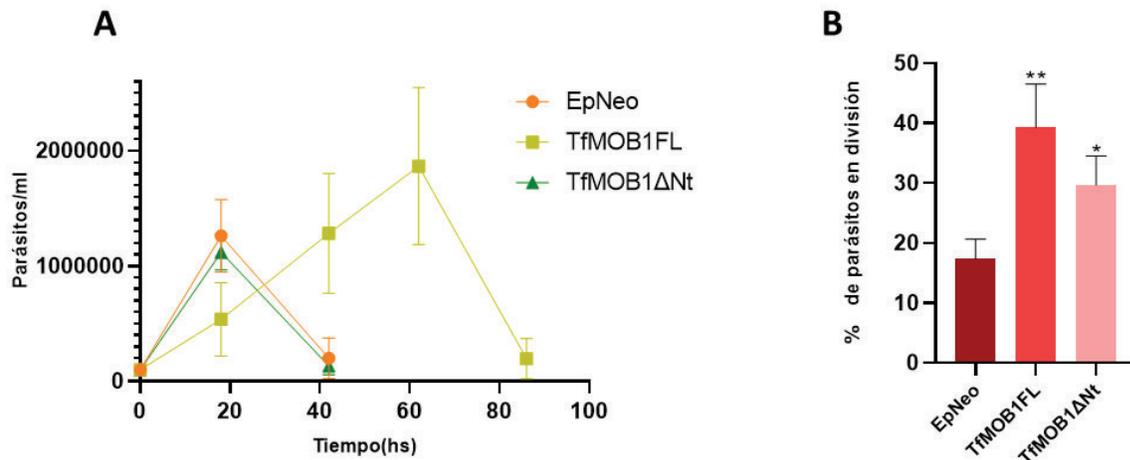


Figura 27: Análisis de la proliferación de parásitos TfMOB1FL, TfMOB1ΔNt. (A) Curva de crecimiento de parásitos TfMOB1FL y TfMOB1ΔNt y de los parásitos control (EpNeo). **(B)** Recuento de parásitos EpNeo, TfMOB1FL y TfMOB1ΔNt con 2 o más núcleos. Las barras representan el promedio de tres recuentos independientes. El análisis estadístico se llevó a cabo con ANOVA de un factor, y las comparaciones de a pares con el test de Tuckey- $p < 0,005$.

Teniendo en cuenta que las tasas de crecimiento nos brindan información acerca de la velocidad a la que una población de microorganismos aumenta en número en un período de tiempo específico; y que dichas tasas están influenciadas por varios factores que incluyen la disponibilidad de nutrientes, la temperatura, el pH, la presión, y otros factores ambientales; nos propusimos estimar comparativamente las tasas de crecimiento de los parásitos TfMOB1FL y TfMOB1ΔNt en condiciones normales de cultivo, y en condiciones de estrés nutricional. El objetivo de este ensayo fue evaluar en profundidad el efecto de la sobreexpresión de ambas versiones de TfMOB1 en el crecimiento de parásitos en ambos contextos. Inicialmente, las tasas de crecimiento en condiciones normales de cultivo se calcularon a partir de los datos obtenidos de la curva de crecimiento mostrada en la **Figura 27A**. En estas condiciones los parásitos TfMOB1FL presentaron una tasa de división significativamente menor (3,7%) respecto a los parásitos TfEpNeo (14,1%); indicando un efecto negativo de la sobreexpresión de TfMOB1FL en el crecimiento de los parásitos. Aquellos parásitos TfMOB1ΔNt no presentaron diferencias significativas en sus tasas de crecimiento (13,6%) al compararlas con los parásitos control (**Fig. 28A**). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de TfMOB1FL genera alteraciones en el crecimiento de los parásitos; y que la porción deletada del N-terminal de TfMOB1 no estaría afectando la proliferación normal de estos parásitos incubados en condiciones estándar de cultivo. Luego, para analizar el crecimiento en condiciones de estrés nutricional de los parásitos TfEpNeo, TfMOB1FL, TfMOB1ΔNt, calculamos las tasas de crecimiento de dichos parásitos incubados en medio TYM en ausencia de suero (estrés nutricional). Las tasas de crecimiento

de los parásitos EpNeo fueron similares a los parásitos TfMOB1FL, en un 3,7% y 3,6%, respectivamente. Por otro lado, los parásitos que sobreexpresaban la versión truncada de la proteína tuvieron una mayor tasa de crecimiento (6%) en estas condiciones, respecto a los parásitos EpNeo (**Fig. 28B**). Al comparar las tasas de crecimiento en la misma población de parásitos, en presencia o en ausencia de suero, observamos que la tasa de crecimiento (en ausencia de suero) de los parásitos EpNeo disminuyó de un 14% en presencia de sueros a un 3,7%. Estos resultados concuerdan con lo observado a lo largo de todo este trabajo: en ausencia de nutrientes el parásito disminuye su proliferación. En cuanto a los parásitos TfMOB1FL, observamos que no presentaron variación significativa en comparación con los parásitos cultivados en presencia de nutrientes, con tasas de 3,6% y 3,7%, respectivamente. Por su parte, aquellos parásitos TfMOB1ΔNt también disminuyeron significativamente su tasa de crecimiento: 13,7% cuando fueron cultivados en presencia de suero, y un 6% cuando fueron incubados en ausencia de suero (**Fig. 28C**). Este hallazgo indicaría que la sobreexpresión de TfMOB1FL estaría retrasando el crecimiento de los parásitos en presencia nutrientes, y que el retraso de crecimiento debido a la restricción de nutrientes no estaría asociado a la función de MOB1. Este resultado encuentra respaldo en la literatura, donde se ha descrito que la activación de esta vía conduce a un freno en la proliferación celular.

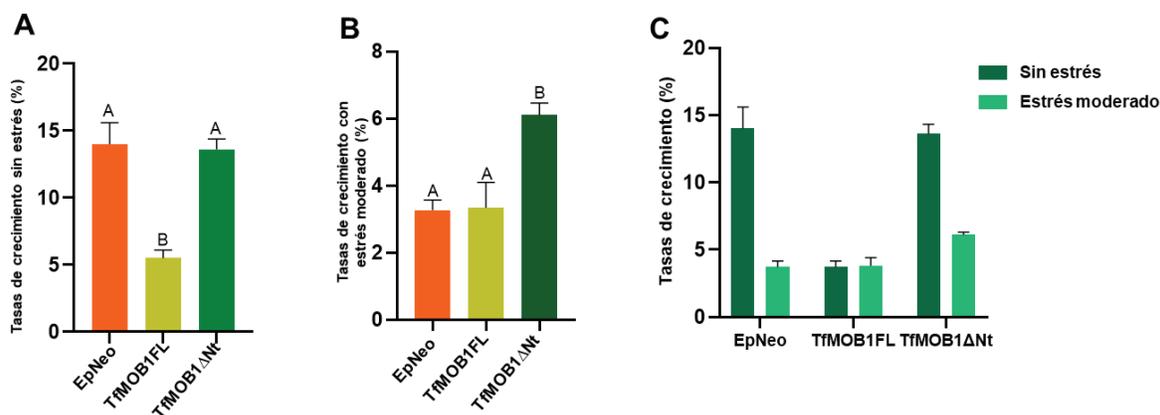


Figura 28: Análisis del crecimiento de parásitos TfMOB1FL y TfMOB1ΔNt. (A) Tasas de crecimiento de parásitos EpNeo, TfMOB1FL, TfMOB1ΔNt calculadas a partir del crecimiento de estos parásitos en medio de cultivo estándar suplementado con suero (sin estrés). Las barras representan el promedio de tasas de crecimiento obtenidas en tres ensayos independientes. Las barras de error representan el error estándar. El análisis fue llevado a cabo con ANOVA y las comparaciones de a pares se hicieron con el Test de Tuckey con $p < 0,005$. **(B)** Tasas de crecimiento de parásitos EpNeo, TfMOB1FL y TfMOB1ΔNt calculadas a partir del crecimiento de estos parásitos en medio de cultivo estándar sin suero (estrés moderado). Las barras representan el promedio de tasas de crecimiento

obtenidas en tres ensayos independientes. Las barras de error representan el error estándar. El análisis fue llevado a cabo con ANOVA y las comparaciones de a pares se hicieron con el Test de Tuckey con $p < 0,005$. **(C)** Comparación de las tasas de crecimiento mencionadas en los puntos C y D. Las barras representan el promedio de tasas de crecimiento obtenidas en tres ensayos independientes. Las barras de error representan el error estándar. Las comparaciones de a pares se llevaron a cabo mediante test T con $p < 0,005$.

Parásitos TfMOB1FL no aumentan su contenido de ADN en condiciones de estrés nutricional

Entre las diversas funciones de las proteínas que componen la vía Hippo, se destaca su rol crucial en el mantenimiento de la ploidía en *Drosophila* y en líneas celulares de mamíferos^{132 133 126 155}. En células de mamíferos (donde existe un estricto control de la ploidía), los componentes de la vía Hippo muestran altos niveles de expresión. También se sabe que estos niveles de expresión disminuyen en células que permiten la ocurrencia de endociclos y experimentan un aumento en el contenido del material genético. Este patrón de expresión sugiere una función clave de la vía Hippo en la regulación fina de la ploidía en contextos celulares específicos.

En el capítulo 1 del presente trabajo, demostramos que durante el ciclo de vida de *T. foetus*, el parásito tiene la capacidad de endoreplicar su ADN cuando se encuentra en condiciones de estrés nutricional. Además, determinamos que existe una disminución en los niveles de expresión de *Tfmob1* cuando el parásito se encuentra en condiciones de estrés nutricional. Este último hallazgo nos sugiere una posible relación entre la proteína TfMOB1 y la respuesta del parásito frente a situaciones de escasez de nutrientes. Por lo antes planteado, evaluamos el posible rol de la proteína TfMOB1 en la respuesta frente al estrés nutricional y su posible relación con las variaciones del contenido de ADN. Inicialmente, determinamos el contenido de ADN mediante citometría de flujo de parásitos EpNeo, TfMOB1FL y TfMOB1ΔNt incubados durante 24hs y 48 horas en medio TYM sin suero (estrés nutricional moderado). Paralelamente, analizamos el contenido de ADN de las poblaciones de parásitos EpNeo, TfMOB1FL y TfMOB1ΔNt en total ausencia de nutrientes (incubados 24 horas en agua), tratamiento al cual denominamos “estrés nutricional severo”. Al comparar el contenido de ADN de los parásitos en las distintas condiciones de cultivo, observamos que los TfEpNeo tenían la capacidad de aumentar su contenido de ADN cuando se los sometía a estrés nutricional. En condiciones normales de cultivo, los parásitos del control EpNeo presentaron un 12,2% de células con más de dos veces su contenido de ADN. Cuando se incubaron por 24hs y 48 horas en ausencia de suero, este porcentaje aumentó a 20,5% y 22,5%, respectivamente. Los parásitos TfMOB1FL mantuvieron constante el porcentaje de células con más de dos veces el contenido de ADN, siendo 19,7%, 21,7% y 20,24% para los parásitos incubados en medio de cultivo estándar con suero, y sin suero a las 24hs y a las

48 hs, respectivamente. Por su parte, los parásitos TfMOB1ΔNt no mostraron variaciones significativas en el porcentaje de células con más de dos veces su contenido de ADN; ya sea creciendo en medio con suero (21,51%) ó en medio estándar sin suero durante 24 horas (16,5%), ó durante 48 horas (23,6%). Por otra parte, cuando la falta de nutrientes fue absoluta (incubación durante 24 horas en agua), tanto los parásitos EpNeo como aquellos TfMOB1ΔNt presentaron un aumento significativo en el porcentaje de parásitos con más de dos veces el contenido de ADN. El porcentaje para los parásitos EpNeo fue del 33,18%, y para los parásitos TfMOB1ΔNt fue del 33,81%. Contrariamente, los parásitos TfMOB1FL mantuvieron el porcentaje de parásitos (23,7%) con más de dos veces el contenido de ADN; sin sufrir cambios significativos en comparación con aquellos parásitos incubados en medio estándar conteniendo suero (**Fig. 29**). Estos resultados demuestran que los parásitos que sobreexpresaban la versión TfMOB1FL mantuvieron constante su contenido de ADN durante el estrés nutricional (moderado y severo), por ende, no fueron eficientes para aumentar su contenido de ADN ó ploidía. Por otro lado, los parásitos TfMOB1ΔNt solo aumentaron su contenido de ADN frente al estímulo de estrés nutricional severo.

Estos resultados nos sugieren una participación de la TfMOB1 en el punto de control de la ploidía; y por ende en la regulación del proceso de endoreplicación del ADN que acontece en *T. foetus* en situaciones de estrés.

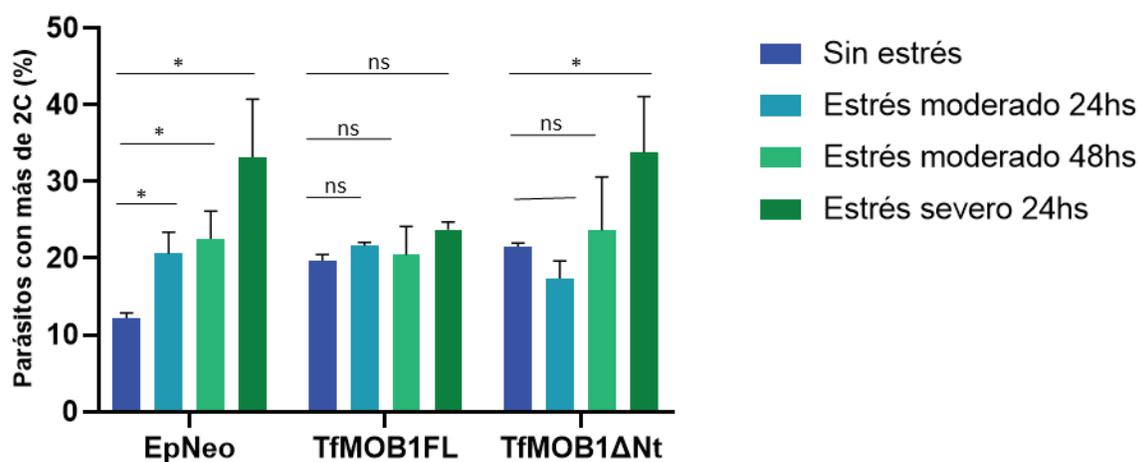


Figura 29: Análisis del contenido de ADN de parásitos TfEpNeo, TfMOB1FL y TfMOB1ΔNt. Porcentaje de parásitos con más de dos veces el contenido de ADN de parásitos EpNeo, TfMOB1FL, TfMOB1ΔNt incubados en medio de cultivo estándar (sin estrés), en medio de cultivo estándar sin suero (estrés moderado) durante 24hs y 48 hs, y 24 horas en agua (estrés severo). Las barras representan en promedio de tres ensayos independientes. Las comparaciones se hicieron por población de parásitos de a pares usando como control el valor de los parásitos crecidos en medio de cultivo estándar. El test de análisis para cada comparación fue el de test T.

DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO 2

La familia MOB incluye un grupo de proteínas no catalíticas conservadas evolutivamente, cuyos miembros están implicados en la salida mitótica (permiten la transición de la mitosis a la citocinesis), y la coordinación de la progresión del ciclo celular con la polaridad y la morfogénesis celular^{163 169 145 170}. Estas proteínas suelen localizarse dentro de las células relacionadas a las estructuras involucradas en la progresión del ciclo celular. En *T. foetus*, observamos que MOB1 se localiza en el citoplasma y el núcleo; y que dicha localización es variable dependiendo de las fases del ciclo celular. Estos resultados coinciden con los observados en *Drosophila*, donde la DmMOB1 presenta una localización celular similar¹⁴². En *S. cerevisiae*, se demostró que la localización subcelular de ScMOB1 es dinámica a lo largo del ciclo celular ya que en la anafase MOB1 se localiza en los cuerpos polares del huso (equivalentes funcionales de los centrosomas en levaduras) y al final de la gemación se reubica en el cuello de la yema permaneciendo allí hasta la abscisión final¹⁶³. Otro estudio demostró que MOB1 también colocaliza con Cdc14 en los cinetocoros de estos organismos¹⁷¹. En *S. pombe*, MOB1 está presente en los cuerpos polares del huso durante toda la mitosis; y en las etapas tardías de dicho proceso se acumula en el anillo medio, donde se forma el septo que completa la división celular¹⁴⁷. En *A. thaliana*, la AtMOB1 se localiza en el citoplasma, en la membrana plasmática y en el núcleo. En humanos, la proteína MOB tiene una localización dinámica: en el centrosoma durante la mitosis temprana, luego en la zona media del huso y finalmente en el cuerpo medio en las etapas posteriores de la mitosis (formación y función del huso mitótico y citocinesis)¹⁷². En cuanto a los protozoarios, *Tetrahymena* acumula MOB1 en los cuerpos basales en el polo posterior de la célula¹⁴⁹. En *Toxoplasma gondii* MOB1 se localiza entre los núcleos en formación durante la división celular¹⁶⁰ y en *T. brucei*, es citosólica y excluye al núcleo durante la división celular¹⁵⁸. Estos datos demuestran que la función conservada de MOB1 no depende completamente de una localización subcelular conservada. En *T. foetus* la localización de MOB1 depende de las fases del ciclo celular, y esto podría atribuirse al tipo de mitosis que presenta este organismo (cerrada). En las mitosis cerradas es frecuente que las proteínas involucradas en el proceso de división celular ingresen ó salgan del núcleo a través de los poros nucleares¹⁶². Nosotros observamos que durante la fase G1, la TfMOB1 si bien se encuentra en el citoplasma y el núcleo, la señal nuclear es más intensa; y que cuando los parásitos se encuentran en las fases G2-M la señal es más homogénea en toda la célula. En este contexto, recordemos que los trichomonadidos se dividen por criptopleuromitosis (conservando la integridad de la envoltura nuclear durante todo el proceso), en la cual el huso completo es extranuclear (incluidos centros organizadores de microtúbulos ó MTOCs, el huso central y las fibras cromosómicas)^{52 51}. Si consideramos que la TfMOB1 pueda estar asociada funcionalmente a las estructuras involucradas en la mitosis; resulta coherente considerar que durante las fases G2-M, la TfMOB1 esté presente de manera homogénea en

todo el parásito (ó sea que no se concentre en el núcleo, considerando que las estructuras del huso que participan en estas fases se encuentran en el citosol).

Estudios realizados en levaduras, ciliados y en células humanas ^{159 149 165 173 174 175} indican que la abundancia y localización de las proteínas MOB debe estar finamente regulada en zonas definidas de las células para que desempeñen su función de manera eficiente. La ausencia de niveles correctos de proteína MOB en la región del surco compromete el posicionamiento del plano de división y el mecanismo de abscisión, es decir, la citocinesis ^{57 147}. En concordancia, los niveles de la mayoría de las proteínas implicadas en la progresión del ciclo celular están regulados a través de la expresión periódica de sus ARNm durante el ciclo celular ¹⁷⁶. La expresión de estos reguladores ocurre en dos ondas de expresión durante las transiciones de las fases G1/S y G2/M. El grupo G1/S, comprende los genes que regulan la síntesis del ADN (incluidos el metabolismo, la replicación y la reparación del ADN). El grupo, G2/M, incluye a aquellos genes involucrados en la mitosis (ensamblaje del huso, la segregación cromosómica y la citocinesis) ¹⁷⁷. En este capítulo demostramos que existe una expresión diferencial de *Tfmob1* durante las fases del ciclo celular; siendo más altos los niveles de expresión en aquellos parásitos que se encontraban en las fases G2-M del ciclo celular; por ende, en parásitos durante división activa. En concordancia, patrones similares de expresión de la proteína MOB fueron observados en plantas, específicamente en *M. sativa*, donde se determinó un aumento en la expresión del gen *Msmob1* en tejidos con proliferación activa ⁵⁷. Datos obtenidos en *T. gondii* y *Eimeria tenella* mostraron niveles más altos de ARNm de MOB1 durante la fase sexual de estos parásitos ^{178 179 180 181} En contraste, en *S. pombe*, no se observaron cambios significativos tanto en los niveles de la proteína MOB1 como en su ARNm a lo largo del ciclo celular ¹⁴⁷. También determinamos que los niveles de expresión de *Tfmob1* eran bajos en parásitos incubados en condiciones estándar de cultivo, y en condiciones de estrés nutricional estos niveles de expresión eran aún más bajos; lo cual concuerda con lo observado en *D. melanogaster*, donde la MATS se expresa en niveles bajos en los tejidos en desarrollo como parámetro normal ¹⁴⁷.

Nuestros estudios de sobreexpresión para evaluar el efecto de la ganancia de función de TfMOB1 demostraron que la sobreexpresión de TfMOB1 provocó una disminución en la tasa de crecimiento y aumentó el porcentaje de parásitos en división. Estos resultados concuerdan con lo reportado en *T. gondii*, donde la sobreexpresión de la proteína MOB1 generó un retraso en la tasa de replicación de los taquizoítos (forma parasitaria del ciclo asexual) ¹⁶⁰. En el tejido ocular de *Drosophila*, mutaciones en MATS (MOB1) generaron un aumento en la proliferación y la aparición de tumores ¹²⁹. Es sabido que las vías Hippo están conectadas con los puntos de control del ciclo celular, asegurando que la célula complete cada fase correctamente antes de avanzar al siguiente paso; y que esto contribuye a evitar la proliferación celular descontrolada. En *S. cerevisiae*, la vía MEN (equivalente a la vía hippo de mamíferos) es fundamental para asistir las transiciones de metafase-anafase y M/G1 ¹³⁵. La vía SIN en *S. pombe* permite la formación del septo, regulando así el inicio de la citocinesis ¹³⁹; y una vez que los cromosomas son ensamblados correctamente, permite la

transición metafase-anafase mediante una relocalización celular de proteínas componentes de la vía ¹³⁵. En *Trypanosoma brucei* el silenciamiento de MOB1 afecta negativamente la progresión normal del ciclo celular, retrasando la mitosis sin afectar la citocinesis ¹⁵⁸. En *Drosophila* la vía Hippo interviene en varios de los puntos de control del ciclo celular. Específicamente, MATS (MOB1 de *Drosophila*) se localiza en los centrosomas durante la mitosis; es necesaria para la correcta segregación de los cromosomas y la correcta citocinesis. Mutantes de MATs (MOB1) detienen su crecimiento en la etapa larval del segundo estadio y dichas larvas eventualmente mueren; y se ha postulado que la mutación de MATS causa inestabilidad genómica, lo que sugiere su participación en la función del punto de control del ciclo celular.

En los mamíferos los componentes de la vía Hippo regulan el punto de control de ploidía, los controles de la síntesis y daño al ADN, la dinámica de los centrosomas y la mitosis ¹⁸². En líneas celulares tumorales, se encontró que la sobreexpresión de LATS1 ó LATS2 indujo el arresto en las fases G2/M y G1/S ^{183 184 185}. Tanto LATS1 como LATS2 se encuentran en el centrosoma y su pérdida de función resulta en una multinucleación, amplificación centrosomal e inestabilidad genómica; lo que sugiere un rol de ambas proteínas en la progresión del ciclo celular ^{186 187 188 189}. La proteína MOB1A en mamíferos modula la duplicación de los centrosomas y la orientación del huso mitótico ¹⁷³. Se ha observado que la depleción de LATS ó MOB1 prolonga la telofase (genera células con puentes intercelulares persistentes), genera fallas en la citocinesis y afecta la transición M/G1 ¹⁶⁵.

Teniendo en cuenta que los parásitos TfMOB1FL mostraron mayor cantidad de parásitos en división y el rol de la MOB en otros tipos celulares a nivel de la citocinesis; nuestros resultados nos sugieren que el retraso del crecimiento podría deberse a una alteración en el final de la mitosis en estos parásitos. En los parásitos TfMOB1ΔNt, a pesar de no evidenciarse un retraso significativo en el crecimiento, se observó un incremento notable en el porcentaje de parásitos en división en comparación con el grupo de control. Por lo cual la delección estaría generando un fenotipo que podría estar siendo compensado por la proteína endógena. Estos resultados estarían indicando que la porción N-terminal de MOB1 sería importante para ejercer su función durante la división celular, posiblemente debido a la eliminación de los dos residuos fosforilables. En este contexto, se ha reportado que las proteínas MOB se fosforilan y sufren cambios conformacionales que regulan la interacción con las quinasas; y que mutaciones por ejemplo en el N-terminal de ScMob1 arrestan a las levaduras en los estadios finales de la mitosis e inhiben la interacción con la quinasa Dbf2p (LATS1 en mamíferos) ¹⁹⁰. Además, se describieron que las quinasas MST1/2 catalizaban la fosforilación de los residuos de aminoácidos Thr12 y Thr35 de la HsMOB1, y que estas modificaciones postraduccionales ralentizaban la progresión del ciclo celular ¹⁹¹. En mamíferos, la fosforilación de MOB1A/B dependiente de MST1/2 también afecta la transición de mitosis a G1 ¹⁹¹. Además, las células con MOB1A no fosforilable se caracterizan por una progresión acelerada a través de G1/S, pero el mecanismo no se ha explorado más a fondo ¹⁹¹. Sin embargo, dada la estrecha interacción entre MOB1A/B y LATS1/2, será

interesante analizar si MOB1A/B, de la misma manera que LATS1/2, media la transición G1/S a través de un mecanismo similar en el punto de control de tetraploidía G1 ó punto de control de daño al ADN. Es interesante destacar también que, en los últimos años, se considera que las MOB además integran complejos distintos donde pueden no tener socios quinasas; lo que estaría indicando que estamos lejos de tener una imagen completa de sus funciones celulares y la multiplicidad de vías de señalización en las que participan. Esta idea está respaldada por el hecho de que MOB y otros miembros de las vías de Hippo se han asociado con la biogénesis y la función de los cilios ¹⁴⁹. Esto demuestra que tanto la fosforilación como el extremo N- terminal de la proteína MOB tendrían roles variables dependiendo del tipo celular y las diferentes cascadas de señalización; por lo cual el efecto de la delección del extremo N-terminal de TfMOB1 requiere de un análisis más detallado para confirmar su rol en estos parásitos.

Por otro lado, en las líneas celulares de eucariotas superiores, se sabe que el suero actúa como un fuerte inhibidor de la vía Hippo; por ende, en presencia de los componentes del suero, esta vía se reprime, favoreciendo la proliferación celular ¹⁹². *T. foetus*, en ausencia de suero en el cultivo, detiene su división celular. En este contexto, demostramos que la sobreexpresión de la proteína TfMOB1 mantuvo a los parásitos con bajas tasas de crecimiento tanto en presencia como en ausencia de suero, a diferencia de los parásitos control donde solo la falta de suero redujo significativamente la tasa de crecimiento. Adicionalmente, se observó que los parásitos que sobreexpresaban la versión truncada de la proteína TfMOB1, aunque disminuyeron la tasa de crecimiento, no lo hicieron tanto como los parásitos de control, posiblemente debido a un efecto funcional de la proteína en su versión truncada. Estas comparaciones de las tasas de crecimiento sugieren que la proteína TfMOB1 tendría un rol en la regulación de la proliferación celular únicamente en condiciones nutricionales favorables; y mantener la vía en la que participa activada de manera continua, podría mantener baja la proliferación celular. En condiciones nutricionales adversas, el descenso en la tasa de replicación parecería ser independiente de MOB1.

Durante la transición G1/S, período entre el final de la fase G1 y el inicio de la fase S donde se sintetiza el ADN, la célula evalúa si las condiciones son adecuadas para pasar a la fase de replicación del ADN (punto de control de ploidía)^{193 157}. Se sabe que tanto la vía MEN en *S. cerevisiae* ¹⁴⁵ como la vía Hippo en mamíferos y *Drosophila* son las encargadas del mantenimiento de la ploidía ^{194 155}. En situaciones donde no se garantiza la estabilidad de la ploidía estas vías se activan impidiendo la continuación de la proliferación celular ^{154 155}. En células tumorales mamarias, se ha reportado que los genes que pertenecen a la transición G2/M están regulados negativamente en las células poliploides; los genes involucrados en la transición G1/S son regulados positivamente, y los genes relacionados con la citocinesis se encuentran regulados negativamente ¹⁹³. Como describimos en el capítulo 1, *T. foetus* en condiciones de estrés nutricional es capaz de llevar a delante una serie de endociclos y aumentar su contenido de ADN sin realizar la citocinesis final,

generando células poliploides ¹⁹⁵. Los resultados del presente capítulo nos sugieren que en condiciones donde el parásito *T. foetus* tiende a endoreplicar su ADN es necesario que la proteína TfMOB1 presente bajos niveles de expresión; ya que los resultados obtenidos demuestran que la sobreexpresión constante de TfMOB1 disminuye la capacidad de endoreplicación del parásito en condiciones de estrés nutricional. Resultados similares se observan durante la formación de las células gigantes del trofoblasto; las cuales pasan por un estadio de endociclos y aumento de la ploidía; y durante este proceso, los niveles de expresión de LATS (quinasa a la cual se une la MOB1) se ven disminuidos durante la diferenciación ¹⁵⁵. En levaduras, líneas mutantes para MOB1 presentan un aumento de la ploidía ¹⁶³. En este contexto, se ha observado también que en células de mamíferos poliploides la vía Hippo se ve activada ¹⁵⁵. Recordemos que las células que sobreexpresan LATS muestran una reducción en el número de células poliploides, por ende, un aumento en los niveles de LATS previene la formación de endociclos. Estos resultados respaldan la función reguladora de la vía Hippo, particularmente a través de LATS, en el control de la ploidía ¹⁵⁵. Y que además MOB1 y LATS son co-partícipes del punto de control de la ploidía **(ver Fig. 20)**.

En síntesis, nuestros resultados nos indican que la sobreexpresión de la proteína MOB1 en *T. foetus* mantiene estable el contenido de ADN en los parásitos indiferentemente si hay ó no aporte de nutrientes. En cuanto al fenotipo de los parásitos sobreexpresando la versión truncada de la proteína MOB (TfMOB1ΔNt), éstos no fueron eficientes para inducir la endoreplicación frente al estrés moderado, pero sí frente a un estrés severo. Si consideramos que el gen *Tfmob1* mostró mayores niveles de expresión en parásitos que se encontraban en la fase G2-M; y que parásitos sobreexpresando la proteína MOB1 mostraron retraso en el crecimiento sumado a la presencia de mayor cantidad de células en división; nuestros resultados nos estarían sugiriendo un rol de esta proteína en los puntos de control del ciclo celular de las fases G2-M de estos parásitos **(ver Fig. 20)**.

CONSIDERACIONES FINALES

Durante el desarrollo de esta tesis realizamos nuevos aportes relacionados a la caracterización de la división celular del parásito *Tritrichomonas foetus*. A lo largo de los dos capítulos, hemos contribuido significativamente al conocimiento de las diversas formas de división que presenta el parásito; así como también pudimos caracterizar una proteína en particular, y establecer su relación con la regulación del proceso de división en estos protozoarios. En el capítulo 1 reportamos que el parásito puede ser multinucleado durante su ciclo de vida y que esta multinuclearidad se ve favorecida por el estrés de tipo nutricional. A su vez demostramos que estas formas multinucleadas pueden dar origen a varios parásitos en condiciones normales; evidenciando la existencia del mecanismo de fisión múltiple en *T. foetus*. También logramos demostrar que *T. foetus* es capaz de endoreplicar su ADN si es sometido a condiciones de estrés nutricional; lo cual representaría una interesante estrategia de supervivencia y proliferación para este microorganismo; sobre todo si asociamos este proceso con la fisión múltiple mencionada previamente, y con las estructuras similares a quistes (CFW+) también descritas en este trabajo. Finalmente, pudimos identificar genes que podrían estar relacionados con el proceso de endoreplicación del ADN en este protozoario; los cuales serán blancos de futuros estudios a abordar por nuestro grupo de trabajo. Teniendo en cuenta la relevancia de la existencia de este proceso en la naturaleza, es importante destacar que nuestros resultados también podrán contribuir a la comprensión de este proceso en otros tipos celulares. En el capítulo 2, caracterizamos por primera vez una proteína de la vía Hippo en este protozoario (TfMOB1); revelamos su relación con la progresión del ciclo celular del parásito; y pudimos demostrar que TfMOB1 estaría regulando de forma negativa la endoreplicación del ADN.

BIBLIOGRAFIA

1. Bondurant, R. H. Venereal diseases of cattle: natural history, diagnosis, and the role of vaccines in their control. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **21**, 383–408 (2005).
2. Levy, M. G. *et al.* Tritrichomonas foetus and not Pentatrichomonas hominis is the etiologic agent of feline trichomonal diarrhea. *J. Parasitol.* **89**, 99–104 (2003).
3. Bondurant, R. H. & Honigberg, B. M. Trichomonads of Veterinary Importance. in 111–188 (Elsevier, 1994). doi:10.1016/B978-0-12-426019-1.50007-6.
4. Benchimol, M. Trichomonads under Microscopy. *Microsc. Microanal. Off. J. Microsc. Soc. Am. Microbeam Anal. Soc. Microsc. Soc. Can.* **10**, 528–550 (2004).
5. Taylor, M. A., Marshall, R. N. & Stack, M. Morphological differentiation of Tritrichomonas foetus from other protozoa of the bovine reproductive tract. *Br. Vet. J.* **150**, 73–80 (1994).
6. Preisner, H. *et al.* The Cytoskeleton of Parabasalian Parasites Comprises Proteins that Share Properties Common to Intermediate Filament Proteins. *Protist* **167**, 526–543 (2016).
7. Ribeiro, K. C., Monteiro-Leal, L. H. & Benchimol, M. Contributions of the Axostyle and Flagella to Closed Mitosis in the Protists Tritrichomonas foetus and Trichomonas vaginalis. *J. Eukaryot. Microbiol.* **47**, 481–492 (2000).
8. Lindmark, D. G. & Müller, M. Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate Tritrichomonas foetus, and its role in pyruvate metabolism. *J. Biol. Chem.* **248**, 7724–7728 (1973).
9. Müller, M. The hydrogenosome. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 2879–2889 (1993).
10. Pereira-Neves, A. & Benchimol, M. Tritrichomonas foetus: Budding from Multinucleated Pseudocysts. *Protist* **160**, 536–551 (2009).

11. Mardones, F. O., Perez, A. M., Martínez, A. & Carpenter, T. E. Risk factors associated with *Tritrichomonas foetus* infection in beef herds in the Province of Buenos Aires, Argentina. *Vet. Parasitol.* **153**, 231–237 (2008).
12. Martin-Gomez S, Gonzalez-Paniello R, Pereira-Bueno J, Ortega-Mora LM. Prevalence of *Tritrichomonas foetus* infection in beef bulls in northwestern Spain. *Veterinary parasitology*. - Buscar con Google. https://www.google.com/search?q=Martin-Gomez+S%2C+Gonzalez-Paniello+R%2C+Pereira-Bueno+J%2C+Ortega-Mora+LM.+Prevalence+of+Tritrichomonas+foetus+infection+in+beef+bulls+in+northwestern+Spain.+Veterinary+parasitology.&aq=Martin-Gomez+S%2C+Gonzalez-Paniello+R%2C+Pereira-Bueno+J%2C+Ortega-Mora+LM.+Prevalence+of+Tritrichomonas+foetus+infection+in+beef+bulls+in+northwestern+Spain.+Veterinary+parasitology.&gs_lcrp=EgZjaHJvbWUyBggAEEUYOdIBBzU4NWowajeoAgCwAgA&sourceid=chrome&ie=UTF-8.
13. Martin, K. A., Henderson, J. & Brewer, M. T. Bovine Trichomonosis Cases in the United States 2015–2019. *Front. Vet. Sci.* **8**, (2021).
14. Ondrak, J. D. *Tritrichomonas foetus* Prevention and Control in Cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **32**, 411–423 (2016).
15. Molina, L., Perea, J., Meglia, G., Angón, E. & García, A. Spatial and temporal epidemiology of bovine trichomoniasis and bovine genital campylobacteriosis in La Pampa province (Argentina). *Prev. Vet. Med.* **110**, 388–394 (2013).
16. Michi, A. N., Favetto, P. H., Kastelic, J. & Cobo, E. R. A review of sexually transmitted bovine trichomoniasis and campylobacteriosis affecting cattle reproductive health. *Theriogenology* **85**, 781–791 (2016).

17. Prolonged survival of venereal *Tritrichomonas foetus* parasite in the gastrointestinal tract, bovine fecal extract, and water | Microbiology Spectrum.
<https://journals.asm.org/doi/10.1128/spectrum.00429-23>.
18. Bastos, B. F., Almeida, F. M. D. & Brener, B. What is known about *Tritrichomonas foetus* infection in cats? *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* **28**, 1–11 (2019).
19. Gookin, J. L. *et al.* Experimental infection of cats with *Tritrichomonas foetus*. *Am. J. Vet. Res.* **62**, 1690–1697 (2001).
20. Rosypal, A. C. *et al.* Survival of a feline isolate of *Tritrichomonas foetus* in water, cat urine, cat food and cat litter. *Vet. Parasitol.* **185**, 279–281 (2012).
21. Xenoulis, P. G., Lopinski, D. J., Read, S. A., Suchodolski, J. S. & Steiner, J. M. Intestinal *Tritrichomonas foetus* infection in cats: a retrospective study of 104 cases. *J. Feline Med. Surg.* **15**, 1098–1103 (2013).
22. Howard, A. & Pelc, S. R. Synthesis of Desoxyribonucleic Acid in Normal and Irradiated Cells and Its Relation to Chromosome Breakage. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* **49**, 207–218 (1986).
23. Lajtha, L. G. ON THE CONCEPT OF THE CELL CYCLE. *J. Cell. Comp. Physiol.* **62**, SUPPL1:143-145 (1963).
24. Lew DJ, *et al.* (1997) | SGD. <https://www.yeastgenome.org/reference/S000058495>.
25. Cavalier-Smith, T. Origin of the cell nucleus, mitosis and sex: roles of intracellular coevolution. *Biol. Direct* **5**, 7 (2010).
26. Deciphering the Evolutionary History of Open and Closed Mitosis - ScienceDirect.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982214012871>.
27. Arnone, J. T., Walters, A. D. & Cohen-Fix, O. The dynamic nature of the nuclear envelope. *Nucleus* **4**, 261–266 (2013).

28. Bremer, N., Tria, F. D. K., Skejo, J. & Martin, W. F. The Ancestral Mitotic State: Closed Orthomitosis With Intranuclear Spindles in the Syncytial Last Eukaryotic Common Ancestor. *Genome Biol. Evol.* **15**, evad016 (2023).
29. Raikov, I. B. The diversity of forms of mitosis in protozoa: a comparative review. *Eur. J. Protistol.* **30**, 253–269 (1994).
30. Amazon.com: The Protozoan Nucleus: Morphology and Evolution (Cell Biology Monographs, 9): 9783709141380: Raikov, Igor B., Bobrov, Nicholas, Verkhovtseva, Marina: Books. <https://www.amazon.com/Protozoan-Nucleus-Morphology-Evolution-Monographs/dp/3709141389>.
31. Encyclopedia of Soils in the Environment. *ScienceDirect* <http://www.sciencedirect.com:5070/referencework/9780123485304/encyclopedia-of-soils-in-the-environment>.
32. Salazar-Ardiles, C., Asserella-Rebollo, L. & Andrade, D. C. Free-Living Amoebas in Extreme Environments: The True Survival in our Planet. *BioMed Res. Int.* **2022**, (2022).
33. Edgar, B. A. & Orr-Weaver, T. L. Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell* **105**, 297–306 (2001).
34. Lee, H. O., Davidson, J. M. & Duronio, R. J. Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes Dev.* **23**, 2461–2477 (2009).
35. Lilly, M. A. & Duronio, R. J. New insights into cell cycle control from the Drosophila endocycle. *Oncogene* **24**, 2765–2775 (2005).
36. Fox, D. T. & Duronio, R. J. Endoreplication and polyploidy: insights into development and disease. *Dev. Camb. Engl.* **140**, 3–12 (2013).
37. Zimmet, J. & Ravid, K. Polyploidy: Occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system. *Exp. Hematol.* **28**, 3–16 (2000).

38. Zybina, T. G., Zybina, E. V., Kiknadze, I. I. & Zhelezova, A. I. Polyploidization in the Trophoblast and Uterine Glandular Epithelium of the Endotheliochorial Placenta of Silver Fox (*Vulpes fulvus* Desm.), as Revealed by the DNA Content. *Placenta* **22**, 490–498 (2001).
39. Deng, W. M., Althausen, C. & Ruohola-Baker, H. Notch-Delta signaling induces a transition from mitotic cell cycle to endocycle in *Drosophila* follicle cells. *Dev. Camb. Engl.* **128**, 4737–4746 (2001).
40. Davies, T. *et al.* Cell-intrinsic and -extrinsic mechanisms promote cell-type-specific cytokinetic diversity. *eLife* **7**, e36204 (2018).
41. Berendes, H. D. Salivary gland function and chromosomal puffing patterns in *Drosophila hydei*. *Chromosoma* **17**, 35–77 (1965).
42. Sabelli, P. A. *et al.* Control of cell proliferation, endoreduplication, cell size, and cell death by the retinoblastoma-related pathway in maize endosperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E1827-1836 (2013).
43. (9) DNA endoreduplication in maize endosperm cells: The effect of exposure to short-term high temperature.
https://www.researchgate.net/publication/227534196_DNA_endoreduplication_in_maize_endosperm_cells_The_effect_of_exposure_to_short-term_high_temperature.
44. Weik, R. R. & John, D. T. Cell Size, Macromolecular Composition, and O₂ Consumption During Agitated Cultivation of *Naegleria gruberi**. *J. Protozool.* **24**, 196–200 (1977).
45. Ross, A. G. P., Olds, G. R., Cripps, A. W., Farrar, J. J. & McManus, D. P. Enteropathogens and Chronic Illness in Returning Travelers. *N. Engl. J. Med.* **368**, 1817–1825 (2013).
46. Band, R. N. & Macheiner, C. Environmental induction of multinucleate *Hartmannella rhyssodes*. *Exp. Cell Res.* **31**, 31–38 (1963).

47. Klaus, S. *et al.* Asynchronous nuclear cycles in multinucleated *Plasmodium falciparum* facilitate rapid proliferation. *Sci. Adv.* **8**, eabj5362 (2022).
48. Ultrastructural changes during asexual multiple reproduction in *Trichomonas vaginalis* | SpringerLink. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-011-2705-9>.
49. Stark, J. R. *et al.* Prospective Study of *Trichomonas vaginalis* Infection and Prostate Cancer Incidence and Mortality: Physicians' Health Study. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **101**, 1406–1411 (2009).
50. Centrin4 coordinates cell and nuclear division in *T. brucei* | Journal of Cell Science | The Company of Biologists. <https://journals.biologists.com/jcs/article/121/18/3062/30199/Centrin4-coordinates-cell-and-nuclear-division-in>.
51. Ribeiro, K. C., Mariante, R. M., Coutinho, L. L. & Benchimol, M. Nucleus behavior during the closed mitosis of *Tritrichomonas foetus*. *Biol. Cell* **94**, 289–301 (2002).
52. Ribeiro, K. C., Pereira-Neves, A. & Benchimol, M. The mitotic spindle and associated membranes in the closed mitosis of trichomonads. *Biol. Cell* **94**, 157–172 (2002).
53. Benchimol, M. *et al.* Draft Genome Sequence of *Tritrichomonas foetus* Strain K. *Genome Announc.* **5**, e00195-17 (2017).
54. Lustig, G., Ryan, C. M., Secor, W. E. & Johnson, P. J. *Trichomonas vaginalis* Contact-Dependent Cytolysis of Epithelial Cells. *Infect. Immun.* **81**, 1411–1419 (2013).
55. de Miguel, N., Riestra, A. & Johnson, P. J. Reversible association of tetraspanin with *Trichomonas vaginalis* flagella upon adherence to host cells. *Cell. Microbiol.* **14**, 1797–1807 (2012).
56. Nix, D. E., Tyrrell, R. & Müller, M. Pharmacodynamics of metronidazole determined by a time-kill assay for *Trichomonas vaginalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 1848–1852 (1995).

57. Citterio, S. *et al.* Alfalfa Mob1-like proteins are involved in cell proliferation and are localized in the cell division plane during cytokinesis. *Exp. Cell Res.* **312**, 1050–1064 (2006).
58. Delgadillo, M. G., Liston, D. R., Niazi, K. & Johnson, P. J. Transient and selectable transformation of the parasitic protist *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 4716–4720 (1997).
59. Pertea, M. *et al.* StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat. Biotechnol.* **33**, 290–295 (2015).
60. Robinson, D. O. *et al.* Ploidy and Size at Multiple Scales in the Arabidopsis Sepal. *Plant Cell* **30**, 2308–2329 (2018).
61. Mendell, J. E., Clements, K. D., Choat, J. H. & Angert, E. R. Extreme polyploidy in a large bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 6730–6734 (2008).
62. Peterson, N. G. & Fox, D. T. Communal living: the role of polyploidy and syncytia in tissue biology. *Chromosome Res.* **29**, 245–260 (2021).
63. Pereira-Neves, A., Ribeiro, K. C. & Benchimol, M. Pseudocysts in Trichomonads – New Insights. *Protist* **154**, 313–329 (2003).
64. Beri, D. *et al.* Demonstration and Characterization of Cyst-Like Structures in the Life Cycle of *Trichomonas vaginalis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9**, 430 (2020).
65. Riley, D. E., Krieger, J. N., Miner, D. & Rabinovitch, P. S. *Trichomonas vaginalis*: Dominant G2 Period and G2 Phase Arrest in a Representative of an Early Branching Eukaryotic Lineage. *J. Eukaryot. Microbiol.* **41**, 408–414 (1994).
66. Suresh, K. *et al.* A multiple fission-like mode of asexual reproduction in *Blastocystis hominis*. *Parasitol. Res.* **80**, 523–527 (1994).
67. Kofoed, C. A. & Swezy, O. Mitosis and Multiple Fission in Trichomonad Flagellates. *Proc. Am. Acad. Arts Sci.* **51**, 289–378 (1915).

68. Koren, I., Boussiba, S., Khozin-Goldberg, I. & Zarka, A. Chromochloris zofingiensis (Chlorophyceae) Divides by Consecutive Multiple Fission Cell-Cycle under Batch and Continuous Cultivation. *Biology* **10**, 157 (2021).
69. Borges, V. M., Lopes, U. G., De Souza, W. & Vannier-Santos, M. A. Cell structure and cytokinesis alterations in multidrug-resistant Leishmania (Leishmania) amazonensis. *Parasitol. Res.* **95**, 90–96 (2005).
70. Gangopadhyay, S. S., Ray, S. S., Kennady, K., Pande, G. & Lohia, A. Heterogeneity of DNA content and expression of cell cycle genes in axenically growing *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS clone A. *Mol. Biochem. Parasitol.* **90**, 9–20 (1997).
71. Mukherjee, C., Clark, C. G. & Lohia, A. Entamoeba Shows Reversible Variation in Ploidy under Different Growth Conditions and between Life Cycle Phases. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2**, e281 (2008).
72. Calderano, S. G. *et al.* Trypanosoma cruzi DNA replication includes the sequential recruitment of pre-replication and replication machineries close to nuclear periphery. *Nucleus* **2**, 136–145 (2011).
73. Moldovan, G.-L., Pfander, B. & Jentsch, S. PCNA, the Maestro of the Replication Fork. *Cell* **129**, 665–679 (2007).
74. Rizzoni, M. & Palitti, F. Regulatory mechanism of cell division. *Exp. Cell Res.* **77**, 450–458 (1973).
75. Martínez-Alonso, D. & Malumbres, M. Mammalian cell cycle cyclins. *Semin. Cell Dev. Biol.* **107**, 28–35 (2020).
76. Gandarillas, A., Molinuevo, R. & Sanz-Gómez, N. Mammalian endoreplication emerges to reveal a potential developmental timer. *Cell Death Differ.* **25**, 471–476 (2018).

77. Rotelli, M. D. *et al.* A Cyclin A—Myb-MuvB—Aurora B network regulates the choice between mitotic cycles and polyploid endoreplication cycles. *PLOS Genet.* **15**, e1008253 (2019).
78. Pradhan, T., Gupta, O., Singh, G. & Monga, V. Aurora kinase inhibitors as potential anticancer agents: Recent advances. *Eur. J. Med. Chem.* **221**, 113495 (2021).
79. Yan, M. *et al.* Aurora-A Kinase: A Potent Oncogene and Target for Cancer Therapy. *Med. Res. Rev.* **36**, 1036–1079 (2016).
80. Meraldi, P., Honda, R. & Nigg, E. A. Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. *EMBO J.* **21**, 483–492 (2002).
81. Hirano, T. Condensin-Based Chromosome Organization from Bacteria to Vertebrates. *Cell* **164**, 847–857 (2016).
82. Uhlmann, F. SMC complexes: from DNA to chromosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 399–412 (2016).
83. D’Urso, G., Grallert, B. & Nurse, P. DNA polymerase alpha, a component of the replication initiation complex, is essential for the checkpoint coupling S phase to mitosis in fission yeast. *J. Cell Sci.* **108**, 3109–3118 (1995).
84. Mouse MCM proteins: complex formation and transportation to the nucleus - Kimura - 1996 - Genes to Cells - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2443.1996.840284.x>.
85. Madine, M. A., Khoo, C.-Y., Mills, A. D. & Laskey, R. A. MCM3 complex required for cell cycle regulation of DNA replication in vertebrate cells. *Nature* **375**, 421–424 (1995).
86. Feger, G. *et al.* dpa, a member of the MCM family, is required for mitotic DNA replication but not endoreplication in *Drosophila*. *EMBO J.* **14**, 5387–5398 (1995).
87. Barnum, K. J. & O’Connell, M. J. Cell Cycle Regulation by Checkpoints. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1170**, 29–40 (2014).

88. Moberg, K. H., Bell, D. W., Wahrer, D. C. R., Haber, D. A. & Hariharan, I. K. Archipelago regulates Cyclin E levels in Drosophila and is mutated in human cancer cell lines. *Nature* **413**, 311–316 (2001).
89. Fishel, E. A. & Dixit, R. Role of nucleation in cortical microtubule array organization: variations on a theme. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **75**, 270–277 (2013).
90. Buss, G., Stratton, M. B., Milenkovic, L. & Stearns, T. Postmitotic centriole disengagement and maturation leads to centrosome amplification in polyploid trophoblast giant cells. *Mol. Biol. Cell* **33**, ar118 (2022).
91. Chieffi, P. Aurora B: A new promising therapeutic target in cancer. *Intractable Rare Dis. Res.* **7**, 141–144 (2018).
92. Petermann, E., Orta, M. L., Issaeva, N., Schultz, N. & Helleday, T. Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. *Mol. Cell* **37**, 492–502 (2010).
93. Bourgeois, C. F., Mortreux, F. & Auboeuf, D. The multiple functions of RNA helicases as drivers and regulators of gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 426–438 (2016).
94. Zhang, L. & Li, X. DEAD-Box RNA Helicases in Cell Cycle Control and Clinical Therapy. *Cells* **10**, 1540 (2021).
95. Gargantini, P. R., Serradell, M. C., Torri, A. & Lujan, H. D. Putative SF2 helicases of the early-branching eukaryote *Giardia lamblia* are involved in antigenic variation and parasite differentiation into cysts. *BMC Microbiol.* **12**, 284 (2012).
96. EnhancedVolcano. *Bioconductor* <http://bioconductor.org/packages/EnhancedVolcano/>.
97. Mariante, R. M., Guimarães, C. A., Linden, R. & Benchimol, M. Hydrogen peroxide induces caspase activation and programmed cell death in the amitochondrial *Tritrichomonas foetus*. *Histochem. Cell Biol.* **120**, 129–141 (2003).

98. Kirby, H. Observations on the Trichomonad Flagellate of the Reproductive Organs of Cattle. *J. Parasitol.* **37**, 445–459 (1951).
99. Abonyi, A. Examination of nonflagellate and flagellate round forms of *Trichomonas vaginalis* by transmission electron microscopy. *Appl. Parasitol.* **36**, 303–310 (1995).
100. Ovcinnikov, N. M., Delektorskij, V. V. & Kosmacheva, S. A. Ultrastructural characteristics of *Trichomonas vaginalis*. An electron microscopical study. *Sex. Transm. Infect.* **50**, 22–39 (1974).
101. Kirby, H. Displacement of Structures in Trichomonad Flagellates. *Trans. Am. Microsc. Soc.* **66**, 274–278 (1947).
102. Afzan, M. Y. & Suresh, K. Pseudocyst forms of *Trichomonas vaginalis* from cervical neoplasia. *Parasitol. Res.* **111**, 371–381 (2012).
103. Is *Trichomonas tenax* a Parasite or a Commensal? - ScienceDirect.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1434461015000073?via%3Dihub>.
104. Dias-Lopes, G. *et al.* Morphologic study of the effect of iron on pseudocyst formation in *Trichomonas vaginalis* and its interaction with human epithelial cells. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **112**, 664–673 (2017).
105. Hussein, E. M. & Atwa, M. M. Infectivity of *Trichomonas vaginalis* pseudocysts inoculated intra-vaginally in mice. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* **38**, 749–762 (2008).
106. Ribeiro, K., Arnholdt, A. C. & Benchimol, M. Tritrichomonas foetus: induced division synchrony by hydroxyurea. *Parasitol. Res.* **88**, 627–631 (2002).
107. Granger, B. L., Warwood, S. J., Benchimol, M. & De Souza, W. Transient invagination of flagella by Tritrichomonas foetus. *Parasitol. Res.* **86**, 699–709 (2000).
108. Coneva, V. & Chitwood, D. H. Plant architecture without multicellularity: quandaries over patterning and the soma-germline divide in siphonous algae. *Front. Plant Sci.* **6**, (2015).

109. Quinet, T., Samba-Louaka, A., Héchard, Y., Van Doninck, K. & Van der Henst, C. Delayed cytokinesis generates multinuclearity and potential advantages in the amoeba *Acanthamoeba castellanii* Neff strain. *Sci. Rep.* **10**, 12109 (2020).
110. Francia, M. E. & Striepen, B. Cell division in apicomplexan parasites. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 125–136 (2014).
111. Birget, P. L. G., Prior, K. F., Savill, N. J., Steer, L. & Reece, S. E. Plasticity and genetic variation in traits underpinning asexual replication of the rodent malaria parasite, *Plasmodium chabaudi*. *Malar. J.* **18**, 222 (2019).
112. Tarun, A. S., Vaughan, A. M. & Kappe, S. H. I. Redefining the role of de novo fatty acid synthesis in *Plasmodium* parasites. *Trends Parasitol.* **25**, 545–550 (2009).
113. Babbitt, S. E. *et al.* *Plasmodium falciparum* responds to amino acid starvation by entering into a hibernatory state. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, E3278–E3287 (2012).
114. Kofoid, C. A. The Life Cycle of the Protozoa. *Science* **57**, 397–408 (1923).
115. Martinez, P. *et al.* Predicting Division Planes of Three-Dimensional Cells by Soap-Film Minimization. *Plant Cell* **30**, 2255–2266 (2018).
116. Godard, B. G., Dumollard, R., Heisenberg, C.-P. & McDougall, A. Combined effect of cell geometry and polarity domains determines the orientation of unequal division. *eLife* **10**, e75639 (2021).
117. Zielke, N., Edgar, B. A. & DePamphilis, M. L. Endoreplication. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a012948 (2013).
118. Shu, Z., Row, S. & Deng, W.-M. Endoreplication: The Good, the Bad, and the Ugly. *Trends Cell Biol.* **28**, 465–474 (2018).
119. Edgar, B. A., Zielke, N. & Gutierrez, C. Erratum: Endocycles: a recurrent evolutionary innovation for post-mitotic cell growth. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 294–294 (2014).

120. Lang, L. & Schnittger, A. Endoreplication — a means to an end in cell growth and stress response. *Curr. Opin. Plant Biol.* **54**, 85–92 (2020).
121. Lohia, A., Mukherjee, C., Majumder, S. & Dastidar, P. G. Genome Re-duplication and Irregular Segregation Occur During the Cell Cycle of *Entamoeba histolytica*. *Biosci. Rep.* **27**, 373–384 (2007).
122. Rhind, N. & Russell, P. Signaling Pathways that Regulate Cell Division. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a005942 (2012).
123. Cheng, J., Wang, S., Dong, Y. & Yuan, Z. The Role and Regulatory Mechanism of Hippo Signaling Components in the Neuronal System. *Front. Immunol.* **11**, (2020).
124. Boopathy, G. T. K. & Hong, W. Role of Hippo Pathway-YAP/TAZ Signaling in Angiogenesis. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**, (2019).
125. Kwon, Y. *et al.* The Hippo Signaling Pathway Interactome. *Science* **342**, 737–740 (2013).
126. Xu, T., Wang, W., Zhang, S., Stewart, R. A. & Yu, W. Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* *lats* gene encodes a putative protein kinase. *Development* **121**, 1053–1063 (1995).
127. Justice, R. W., Zilian, O., Woods, D. F., Noll, M. & Bryant, P. J. The *Drosophila* tumor suppressor gene *warts* encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes Dev.* **9**, 534–546 (1995).
128. Bettencourt-Dias, M. *et al.* Genome-wide survey of protein kinases required for cell cycle progression. *Nature* **432**, 980–987 (2004).
129. Lai, Z.-C. *et al.* Control of Cell Proliferation and Apoptosis by *Mob* as Tumor Suppressor, *Mats*. *Cell* **120**, 675–685 (2005).

130. Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K. & Pan, D. The Hippo Signaling Pathway Coordinately Regulates Cell Proliferation and Apoptosis by Inactivating Yorkie, the Drosophila Homolog of YAP. *Cell* **122**, 421–434 (2005).
131. Zhou, Q., Li, L., Zhao, B. & Guan, K.-L. The hippo pathway in heart development, regeneration, and diseases. *Circ. Res.* **116**, 1431–1447 (2015).
132. Dong, J. *et al.* Elucidation of a universal size-control mechanism in Drosophila and mammals. *Cell* **130**, 1120–1133 (2007).
133. Camargo, F. D. *et al.* YAP1 increases organ size and expands undifferentiated progenitor cells. *Curr. Biol. CB* **17**, 2054–2060 (2007).
134. Hergovich, A., Bichsel, S. J. & Hemmings, B. A. Human NDR Kinases Are Rapidly Activated by MOB Proteins through Recruitment to the Plasma Membrane and Phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 8259–8272 (2005).
135. Bardin, A. J. & Amon, A. MEN and SIN: what's the difference? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 815–826 (2001).
136. McCollum, D. & Gould, K. L. Timing is everything: regulation of mitotic exit and cytokinesis by the MEN and SIN. *Trends Cell Biol.* **11**, 89–95 (2001).
137. Delgado, I. L. S. *et al.* MOB: Pivotal Conserved Proteins in Cytokinesis, Cell Architecture and Tissue Homeostasis. *Biology* **9**, 413 (2020).
138. Weiss, E. L. Mitotic Exit and Separation of Mother and Daughter Cells. *Genetics* **192**, 1165–1202 (2012).
139. Schmidt, S., Sohrmann, M., Hofmann, K., Woollard, A. & Simanis, V. The Spg1p GTPase is an essential, dosage-dependent inducer of septum formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev.* **11**, 1519–1534 (1997).

140. Sparks, C. A., Morpew, M. & McCollum, D. Sid2p, a spindle pole body kinase that regulates the onset of cytokinesis. *J. Cell Biol.* **146**, 777–790 (1999).
141. Hou, M. C., Salek, J. & McCollum, D. Mob1p interacts with the Sid2p kinase and is required for cytokinesis in fission yeast. *Curr. Biol. CB* **10**, 619–622 (2000).
142. Shimizu, T., Ho, L.-L. & Lai, Z.-C. The mob as tumor suppressor Gene Is Essential for Early Development and Regulates Tissue Growth in Drosophila. *Genetics* **178**, 957–965 (2008).
143. Gregory, S. L. *et al.* A Drosophila overexpression screen for modifiers of Rho signalling in cytokinesis. *Fly (Austin)* **1**, 13–22 (2007).
144. Duhart, J. C. & Raftery, L. A. Mob Family Proteins: Regulatory Partners in Hippo and Hippo-Like Intracellular Signaling Pathways. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, (2020).
145. Luca, F. C. & Winey, M. *MOB1*, an Essential Yeast Gene Required for Completion of Mitosis and Maintenance of Ploidy. *Mol. Biol. Cell* **9**, 29–46 (1998).
146. Hou, M.-C., Guertin, D. A. & McCollum, D. Initiation of Cytokinesis Is Controlled through Multiple Modes of Regulation of the Sid2p-Mob1p Kinase Complex. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 3262–3276 (2004).
147. Salimova, E., Sohrmann, M., Fournier, N. & Simanis, V. The *S. pombe* orthologue of the *S. cerevisiae* *mob1* gene is essential and functions in signalling the onset of septum formation. *J. Cell Sci.* **113 (Pt 10)**, 1695–1704 (2000).
148. Chalker, D. L. & Frankel, J. Morphogenesis: A Mob Rules from the Rear. *Curr. Biol.* **24**, R700–R702 (2014).
149. Tavares, A., Gonçalves, J., Florindo, C., Tavares, A. A. & Soares, H. Mob1: defining cell polarity for proper cell division. *J. Cell Sci.* **125**, 516–527 (2012).
150. Pan, D. The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev. Cell* **19**, 491–505 (2010).

151. Gentric, G., Desdouets, C. & Celton-Morizur, S. Hepatocytes Polyploidization and Cell Cycle Control in Liver Physiopathology. *Int. J. Hepatol.* **2012**, 282430 (2012).
152. Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer - PubMed.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26544935/>.
153. Ganem, N. J. *et al.* Cytokinesis failure triggers hippo tumor suppressor pathway activation. *Cell* **158**, 833–848 (2014).
154. Hippo Signaling Suppresses Cell Ploidy and Tumorigenesis through Skp2 - PubMed.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28486106/>.
155. Basak, T. & Ain, R. Molecular regulation of trophoblast stem cell self-renewal and giant cell differentiation by the Hippo components YAP and LATS1. *Stem Cell Res. Ther.* **13**, 189 (2022).
156. Losick, V. P., Fox, D. T. & Spradling, A. C. Polyploidization and cell fusion contribute to wound healing in the adult *Drosophila* epithelium. *Curr. Biol. CB* **23**, 2224–2232 (2013).
157. Losick, V. P., Jun, A. S. & Spradling, A. C. Wound-Induced Polyploidization: Regulation by Hippo and JNK Signaling and Conservation in Mammals. *PLOS ONE* **11**, e0151251 (2016).
158. Hammarton, T. C., Lillico, S. G., Welburn, S. C. & Mottram, J. C. *Trypanosoma brucei* MOB1 is required for accurate and efficient cytokinesis but not for exit from mitosis. *Mol. Microbiol.* **56**, 104–116 (2005).
159. Jiang, Y.-Y. *et al.* Two Antagonistic Hippo Signaling Circuits Set the Division Plane at the Medial Position in the Ciliate Tetrahymena. *Genetics* **211**, 651–663 (2019).
160. Delgado, I. L. S. *et al.* Characterization of a MOB1 Homolog in the Apicomplexan Parasite *Toxoplasma gondii*. *Biology* **10**, 1233 (2021).
161. Chen, Y. *et al.* Systematic analysis of the Hippo pathway organization and oncogenic alteration in evolution. *Sci. Rep.* **10**, 3173 (2020).

162. Zhou, Q., Hu, H. & Li, Z. New Insights into the Molecular Mechanisms of Mitosis and Cytokinesis in Trypanosomes. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **308**, 127–166 (2014).
163. Luca, F. C. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* Mob1p is required for cytokinesis and mitotic exit. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 6972–6983 (2001).
164. Rieder, C. L. & Maiato, H. Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. *Dev. Cell* **7**, 637–651 (2004).
165. Bothos, J., Tuttle, R. L., Ottey, M., Luca, F. C. & Halazonetis, T. D. Human LATS1 is a mitotic exit network kinase. *Cancer Res.* **65**, 6568–6575 (2005).
166. Hergovich, A. *et al.* The MST1 and hMOB1 tumor suppressors control human centrosome duplication by regulating NDR kinase phosphorylation. *Curr. Biol. CB* **19**, 1692–1702 (2009).
167. Stavridi, E. S. *et al.* Crystal structure of a human Mob1 protein: toward understanding Mob-regulated cell cycle pathways. *Struct. Lond. Engl.* **1993** **11**, 1163–1170 (2003).
168. Kim, S.-Y., Tachioka, Y., Mori, T. & Hakoshima, T. Structural basis for autoinhibition and its relief of MOB1 in the Hippo pathway. *Sci. Rep.* **6**, 28488 (2016).
169. Stegmeier, F., Visintin, R. & Amon, A. Separase, polo kinase, the kinetochore protein Slk19, and Spo12 function in a network that controls Cdc14 localization during early anaphase. *Cell* **108**, 207–220 (2002).
170. Nelson, B. *et al.* RAM: A Conserved Signaling Network That Regulates Ace2p Transcriptional Activity and Polarized Morphogenesis. *Mol. Biol. Cell* **14**, 3782–3803 (2003).
171. Weiss, E. L. *et al.* The *Saccharomyces cerevisiae* Mob2p-Cbk1p kinase complex promotes polarized growth and acts with the mitotic exit network to facilitate daughter cell-specific localization of Ace2p transcription factor. *J. Cell Biol.* **158**, 885–900 (2002).

172. Wilmeth, L. J., Shrestha, S., Montaña, G., Rashe, J. & Shuster, C. B. Mutual dependence of Mob1 and the chromosomal passenger complex for localization during mitosis. *Mol. Biol. Cell* **21**, 380–392 (2010).
173. Yan, M. *et al.* Regulation of NDR1 activity by PLK1 ensures proper spindle orientation in mitosis. *Sci. Rep.* **5**, 10449 (2015).
174. Otsubo, K. *et al.* MOB1-YAP1/TAZ-NKX2.1 axis controls bronchioalveolar cell differentiation, adhesion and tumour formation. *Oncogene* **36**, 4201–4211 (2017).
175. Bae, J. S. *et al.* Loss of Mob1a/b impairs the differentiation of mouse embryonic stem cells into the three germ layer lineages. *Exp. Mol. Med.* **51**, 1–12 (2019).
176. Tanenbaum, M. E., Stern-Ginossar, N., Weissman, J. S. & Vale, R. D. Regulation of mRNA translation during mitosis. *eLife* **4**, e07957 (2015).
177. Fischer, M., Schade, A. E., Branigan, T. B., Müller, G. A. & DeCaprio, J. A. Coordinating gene expression during the cell cycle. *Trends Biochem. Sci.* **47**, 1009–1022 (2022).
178. Fritz, H. M. *et al.* Transcriptomic analysis of toxoplasma development reveals many novel functions and structures specific to sporozoites and oocysts. *PLoS One* **7**, e29998 (2012).
179. Ramakrishnan, C. *et al.* An experimental genetically attenuated live vaccine to prevent transmission of *Toxoplasma gondii* by cats. *Sci. Rep.* **9**, 1474 (2019).
180. Reid, A. J. *et al.* Genomic analysis of the causative agents of coccidiosis in domestic chickens. *Genome Res.* **24**, 1676–1685 (2014).
181. Walker, R. A. *et al.* RNA Seq analysis of the *Eimeria tenella* gametocyte transcriptome reveals clues about the molecular basis for sexual reproduction and oocyst biogenesis. *BMC Genomics* **16**, 94 (2015).
182. Xiao, Y. & Dong, J. The Hippo Signaling Pathway in Cancer: A Cell Cycle Perspective. *Cancers* **13**, 6214 (2021).

183. Tao, W. *et al.* Human homologue of the *Drosophila melanogaster* lats tumour suppressor modulates CDC2 activity. *Nat. Genet.* **21**, 177–181 (1999).
184. Yang, B.-C. *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes act via the miR-1263/Mob1/Hippo signaling pathway to prevent apoptosis in disuse osteoporosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **524**, 883–889 (2020).
185. Xia, W. *et al.* Anti-tumor activity of GW572016: a dual tyrosine kinase inhibitor blocks EGF activation of EGFR/erbB2 and downstream Erk1/2 and AKT pathways. *Oncogene* **21**, 6255–6263 (2002).
186. Nishiyama, Y. *et al.* A human homolog of *Drosophila* warts tumor suppressor, h-warts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis. *FEBS Lett.* **459**, 159–165 (1999).
187. Morisaki, T. *et al.* WARTS tumor suppressor is phosphorylated by Cdc2/cyclin B at spindle poles during mitosis. *FEBS Lett.* **529**, 319–324 (2002).
188. Toji, S. *et al.* The centrosomal protein Lats2 is a phosphorylation target of Aurora-A kinase. *Genes Cells* **9**, 383–397 (2004).
189. McPherson, J. P. *et al.* Lats2/Kpm is required for embryonic development, proliferation control and genomic integrity. *EMBO J.* **23**, 3677–3688 (2004).
190. Yoshida, S. & Toh-e, A. Regulation of the localization of Dbf2 and mob1 during cell division of *saccharomyces cerevisiae*. *Genes Genet. Syst.* **76**, 141–147 (2001).
191. Praskova, M., Xia, F. & Avruch, J. MOBKL1A/MOBKL1B phosphorylation by MST1 and MST2 inhibits cell proliferation. *Curr. Biol. CB* **18**, 311–321 (2008).
192. Plouffe, S. W. *et al.* Characterization of Hippo Pathway Components by Gene Inactivation. *Mol. Cell* **64**, 993–1008 (2016).

193. Cell-cycle dependence of transcriptome gene modules: comparison of regression lines - Vinogradov - 2020 - The FEBS Journal - Wiley Online Library.
<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/febs.15257>.
194. Zhang, S. *et al.* Hippo Signaling Suppresses Cell Ploidy and Tumorigenesis through Skp2. *Cancer Cell* **31**, 669-684.e7 (2017).
195. Iriarte, L. S., Martinez, C. I., de Miguel, N. & Coceres, V. M. *Tritrichomonas foetus* Cell Division Involves DNA Endoreplication and Multiple Fissions. *Microbiol. Spectr.* **11**, e03251-22 (2023).

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Iriarte Lucrecia Soledad". The letters are cursive and somewhat stylized.

Iriarte Lucrecia Soledad

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Coceres Veronica". The signature is very stylized and abbreviated.

Coceres Veronica