



---

I N T E C H

**Análisis del rol de la proteína MORN3 en la  
división celular del parásito bovino  
*Tritrichomonas foetus***

---

Lorenzo Rodolfo Vázquez

2024

Tesis para optar por el título de Ingeniero en Agrobiotecnología

**Directora:** Verónica Cóceres

**Codirectora:** Natalia de Miguel

**Guía de laboratorio:** Lucrecia Iriarte

Laboratorio de parásitos anaerobios

Instituto Tecnológico Chascomús (INTECH)

## INDICE

Introducción .....	3
La enfermedad: Tritrichomonosis bovina.....	3
El parásito: <i>Tritrichomonas foetus</i> .....	6
División celular de <i>T. foetus</i> .....	9
Rol de las proteínas con motivos MORN en la división celular.....	12
Objetivos.....	14
Objetivo General.....	14
Objetivos Específicos.....	14
Materiales y métodos.....	14
1. Cultivo de parásitos .....	14
2. Extracción de ADN genómico de <i>Tritrichomonas foetus</i> .....	15
3. Diseño de cebadores.....	16
4. Amplificación de ADN .....	16
5. Clonado y subclonado de TfMORN3 .....	17
6. Transfección de parásitos con el constructo TfMORN3-pMasterNeo-HA.....	21
7. Ensayo de crecimiento de parásitos .....	22
8. Tinción de núcleos.....	23
9. Inmunolocalización .....	23
10. Citometría de flujo .....	24
11. Adhesión de parásitos.....	24
Resultados.....	26
Proteínas con motivos MORN en <i>T. foetus</i> .....	26
La proteína MORN3 presenta localización citosólica en <i>T. foetus</i> .....	28
La sobreexpresión de TfMORN3 altera el crecimiento normal de los parásitos .....	30
Los parásitos TfMORN3 presentan mayor cantidad de núcleos por parásito .....	31
Los parásitos TfMORN3 exhiben los axostilos desordenados.....	33
Los parásitos TfMORN3 presentan forma redondeada y mayor tamaño.....	36
Los parásitos TfMORN3 presentan mayor adherencia a la célula hospedadora.....	37
Discusión .....	39
Conclusión.....	43
Bibliografía.....	45

## **Introducción**

*Tritrichomonas foetus* es un protozooario flagelado extracelular que se caracteriza por su naturaleza anaerobia (Campero y col., 2006; Benchimol 2004; Steinbüchel y col., 1986). Este organismo pertenece al phylum *Metamonada*, clase *Parabasalia*, familia *Trichomonadidae* y al género *Tritrichomonas* (Schoch y col., 2020). *T. foetus* es capaz de colonizar el tracto reproductivo de los bovinos y el intestino de los gatos domésticos (específicamente, el colon y el íleon distal) desencadenando la tritrichomonosis bovina y felina, respectivamente (Frey y col., 2012; Benchimol y col., 2017; Coceres y col., 2021). En el caso de los felinos, este protozooario produce diarrea crónica, y la transmisión del parásito se efectúa a través de la ruta fecal-oral (Gookin y col., 2017). Cabe destacar que además se ha reportado que *T. foetus* puede comportarse como comensal en la mucosa nasal y gastrointestinal de los cerdos; lo que demuestra la complejidad/plasticidad de la relación de este parásito con los distintos hospedadores (Dabrowska y col., 2020).

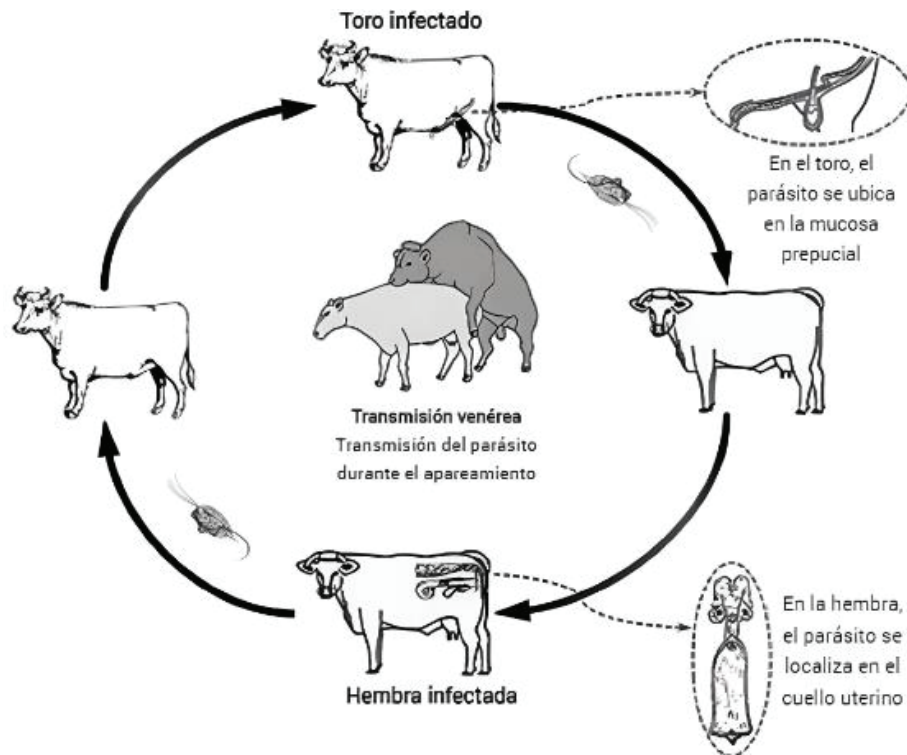
### **La enfermedad: Tritricomonosis bovina**

La tritricomonosis bovina se manifiesta como una enfermedad venérea que provoca considerables pérdidas económicas, especialmente en los sistemas de producción extensivos o semi-extensivos; en los cuales el apareamiento natural es una práctica predominante, y un mismo macho copula con numerosas hembras durante la época reproductiva. Esta es una enfermedad endémica en Argentina (Molina y col., 2018), y además se encuentra distribuida en diferentes regiones del mundo: América del Norte, Sudamérica, África, Asia, Australia y algunas áreas específicas de Europa (Lun y col., 2005; Collántes-Fernández y col., 2018).

Las pérdidas económicas fundamentalmente se deben a que esta parasitosis produce muertes embrionarias tempranas, abortos e infertilidad; contexto en el cual también se consideran aquellos gastos adicionales generados por la eliminación de

los animales portadores del parásito y la consecuente compra de animales para reposición; y aquellos gastos asociados a la atención veterinaria del rodeo (Martin-Gomez y col., 1998). Dicha enfermedad se caracteriza por reducir la tasa de preñez en un 15%-25%, por incrementar los abortos en un 10%, y por provocar la infertilidad en alrededor del 11% del rebaño (Molina y col., 2018); lo cual impacta negativamente en los sistemas de explotación ganadera bovina, donde el objetivo productivo es obtener un ternero/vaca/año.

*T. foetus* se aloja en el tracto genital de sus hospedadores, *Bos taurus taurus* y *Bos taurus indicus* (Collántes-Fernández y col., 2018) y se transmite principalmente mediante la cópula durante la estación reproductiva (BonDurant., 2005) (**Fig.1**); principalmente en los sistemas de producción extensivos. En aquellos sistemas de tipo intensivo, la incidencia de esta parasitosis es baja, debido a que el manejo reproductivo es controlado mediante la utilización de la inseminación artificial, el control sanitario del semen y el descarte de los animales infectados (Campero y col., 2006). En este contexto, es importante destacar que también se han reportado casos de contagio mediante inseminación artificial utilizando semen contaminado con el protozooario; ya que el mismo resiste al proceso de criopreservación (Yule y col., 1989). Por otro lado, existen también reportes de contagios durante los exámenes vaginales utilizando elementos contaminados (Goodger y col., 1986).



**Figura 1:** Ciclo de vida de *Tritrichomonas foetus* en bovinos. Adaptado de Collántes-Fernández y col., 2018.

En los toros, *T. foetus* se aloja en los estratos superficiales de la mucosa de la cavidad prepucial y el tracto genital; lo cual ocurre principalmente en los toros adultos que presentan mayores pliegues prepuciales, y en consecuencia una mayor capacidad para albergar al protozoario. Los machos generalmente son asintomáticos y portadores crónicos; y en estos animales la presencia del protozoario no afecta la libido ni la fertilidad, lo que los convierte en una fuente permanente de infección y de transmisión en los rodeos (Campero y col., 2006).

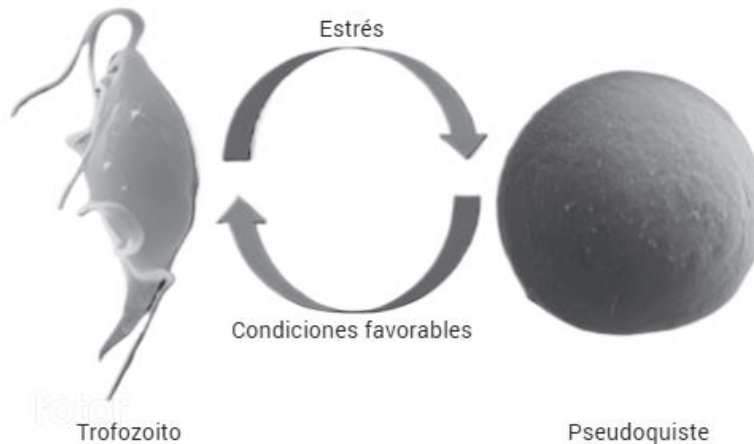
En las hembras, el protozoario invade la vagina después de la cópula y persiste en las secreciones genitales durante semanas. También coloniza el cérvix, el útero, los oviductos y, durante la gestación, la placenta y el feto; lo que provoca la pérdida temprana de la preñez, infertilidad temporal, descargas uterinas, abortos tardíos ocasionales y diferentes grados de endometritis (de moderada a severa). Algunas vacas pueden ser portadoras crónicas, constituyendo una fuente de infección para el rodeo en el próximo servicio. En la placenta, *T. foetus* causa placentitis con

infiltrados de macrófagos y neutrófilos; y en el feto, dicho parásito produce bronconeumonía piogranulomatosa y enteritis necrotizante. Finalmente, los abortos pueden llevar a la expulsión, retención, momificación o maceración del feto. (Campero y col., 2006)

Actualmente, el control de la tritricomonosis es difícil de realizar, ya que no se dispone de agentes terapéuticos específicos ni de vacunas totalmente eficaces contra esta enfermedad. Aunque en el pasado se empleaba el metronidazol como quimioterápico, su eficacia se ha visto comprometida debido a que *T. foetus* ha generado resistencia contra esta droga. En consecuencia, la estrategia principal para el control de la tritricomonosis bovina se focaliza en la detección temprana a través de pruebas diagnósticas, y la eliminación de los toros infectados en el ganado (Pruzzo., 2023).

### **El parásito: *Tritrichomonas foetus***

*T. foetus* puede adoptar dos morfologías diferentes dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre. Una de ellas es el **trofozoíto**, caracterizado por su forma elongada, piriforme, con los flagelos externos, que mide entre 8 y 18 micrómetros de largo por 4 a 9 micrómetros de ancho; y es la forma que predomina cuando las condiciones del entorno son óptimas (Bondurant y col., 1994; Campero y col., 2006; Rae y col., 2006). La otra morfología característica es el **pseudoquiste**, que surge como respuesta a condiciones externas desfavorables (temperaturas hostiles ó deficiencias nutricionales). Estas son estructuras esferoides y con los flagelos internalizados; y a las cuales se las denomina “pseudo” porque carecen de una pared quística verdadera (como la descrita para otros microorganismos formadores de quistes). Cabe destacar que el pseudoquiste es una morfología capaz de revertir a trofozoíto cuando las condiciones externas son óptimas (Campero y col., 2006, Pereira-Neves y col., 2003; Pereira-Neves y col., 2009) (**Fig. 2**).



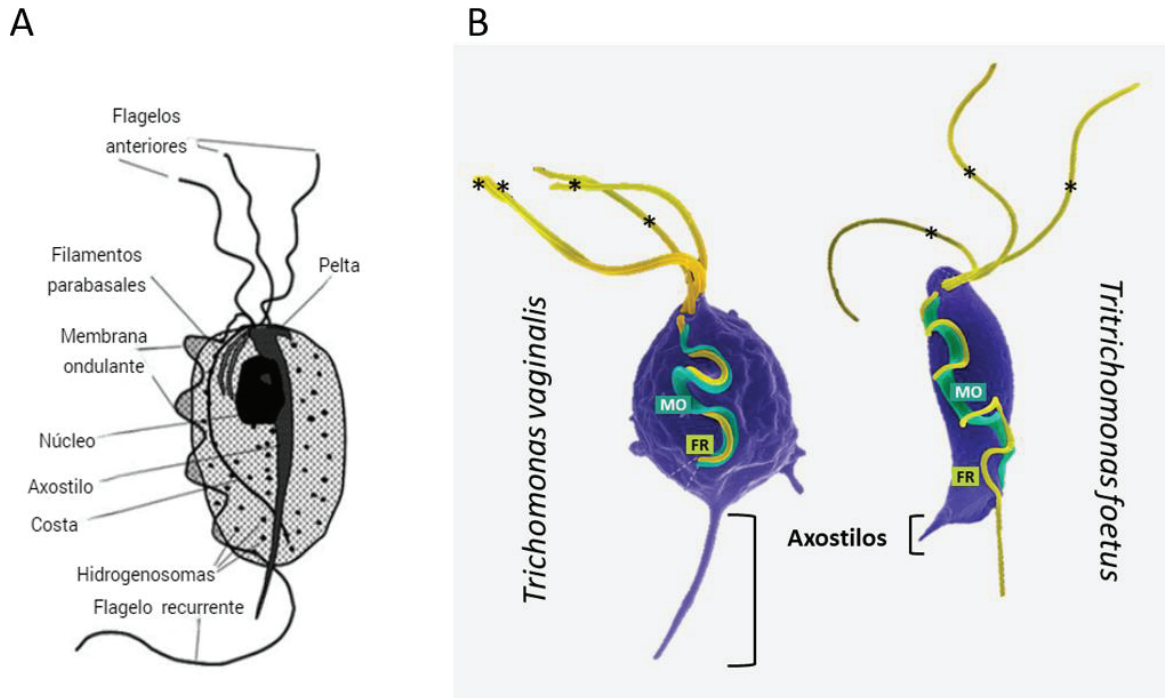
**Figura 2:** Formas de vida de *Tritrichomonas foetus*. Adaptado de *Pereira-Neves y col., 2014*.

En lo que respecta a su estructura celular, *T. foetus* presenta un solo núcleo y cuatro flagelos: tres anteriores (con longitudes que oscilan entre 11 y 17 micrómetros) y un flagelo posterior o recurrente (de 16 micrómetros de largo aproximadamente) que se encuentra adherido al cuerpo celular, asociado a una membrana ondulante (prolongación de la membrana plasmática que contiene de 2 a 5 ondas) (Campero y col., 2006; Rae y col., 2006; Benchimol., 2004) (**Fig. 3**).

Entre las particularidades que presentan estos parásitos se encuentran las organelas denominadas hidrogenosomas; los cuales poseen similitudes funcionales con las mitocondrias y desempeñan un rol crucial en la realización de la glicólisis, y en la producción anaeróbica de ATP a partir de piruvato y de malato. Dichas organelas carecen de genoma propio, cadena respiratoria y citocromos (Campero y col., 2006). En lo que respecta al citoesqueleto, este parásito contiene tres estructuras que no están presentes en otros tipos celulares: la costa, el axostilo y la pelta. La **costa** es una estructura que subyace al flagelo recurrente y que proporciona soporte mecánico a la membrana frente a los movimientos del flagelo recurrente (Benchimol., 2004; Benchimol., 2005). El **axostilo** es una “cinta” axial de aproximadamente 150 microtúbulos, (compuestos principalmente por  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina, con un diámetro de 24nm conectados por delgados puentes filamentosos), que se extiende desde la región anterior hasta el extremo opuesto de la célula;

extendiéndose más allá del soma cubierto por la membrana celular (Benchimol., 2010). Esta estructura se superpone en su parte más ancha con la **pelta** (también compuesta por microtúbulos) formando el complejo axostilo-pelta; el cual produce una especie de hendidura que alberga el núcleo y los cuerpos parabasales (Collántes-Fernández y col., 2018; Benchimol., 2010) (**Fig. 3**). El axostilo tiene tres funciones principales que han sido descritas en los diferentes organismos que los contienen: es una entidad de soporte que sostiene el eje de la célula; tiene un rol en la motilidad; y participa activamente en el proceso de división celular. Específicamente, se ha reportado que dicha estructura posee un rol activo en la constricción del núcleo durante la cariocinesis en tricomonas (Benchimol., 2004; Benchimol., 2005; Ribeiro y col., 2000). En ciertos flagelados, el axostilo está involucrado en la locomoción (Grimstone y col., 1965), pero en *T. foetus* esta estructura no se ha asociado a esta función hasta la fecha (Monteiro-Leal y col., 1996). En el caso de *Trichomonas vaginalis*, existe evidencia de que el axostilo está involucrado en la adherencia inicial a la célula hospedadora (Hsu y col., 2023).



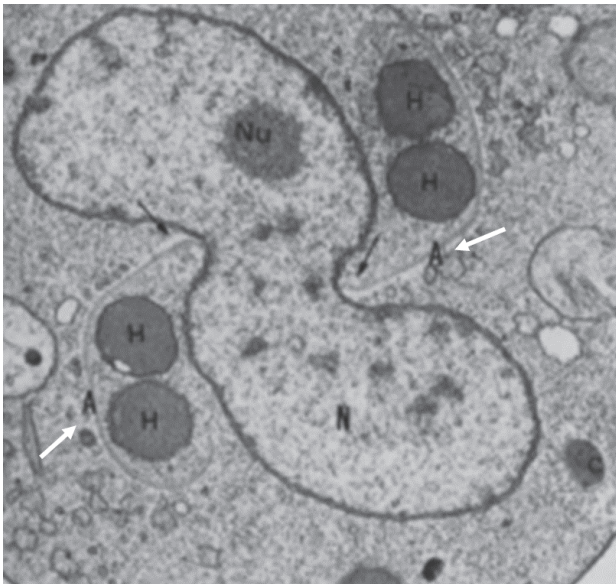


**Figura 3:** **A.** Representación esquemática de *Trichomonas foetus* donde pueden observarse las principales estructuras de este protozooario. **B.** Imagen comparativa que muestra las diferencias en el número de flagelos y en la longitud de los axostilos de *T. vaginalis* y *T. foetus*. MO: membrana ondulante. FR: flagelo recurrente. Los asteriscos señalan los flagelos individualmente. Adaptado de

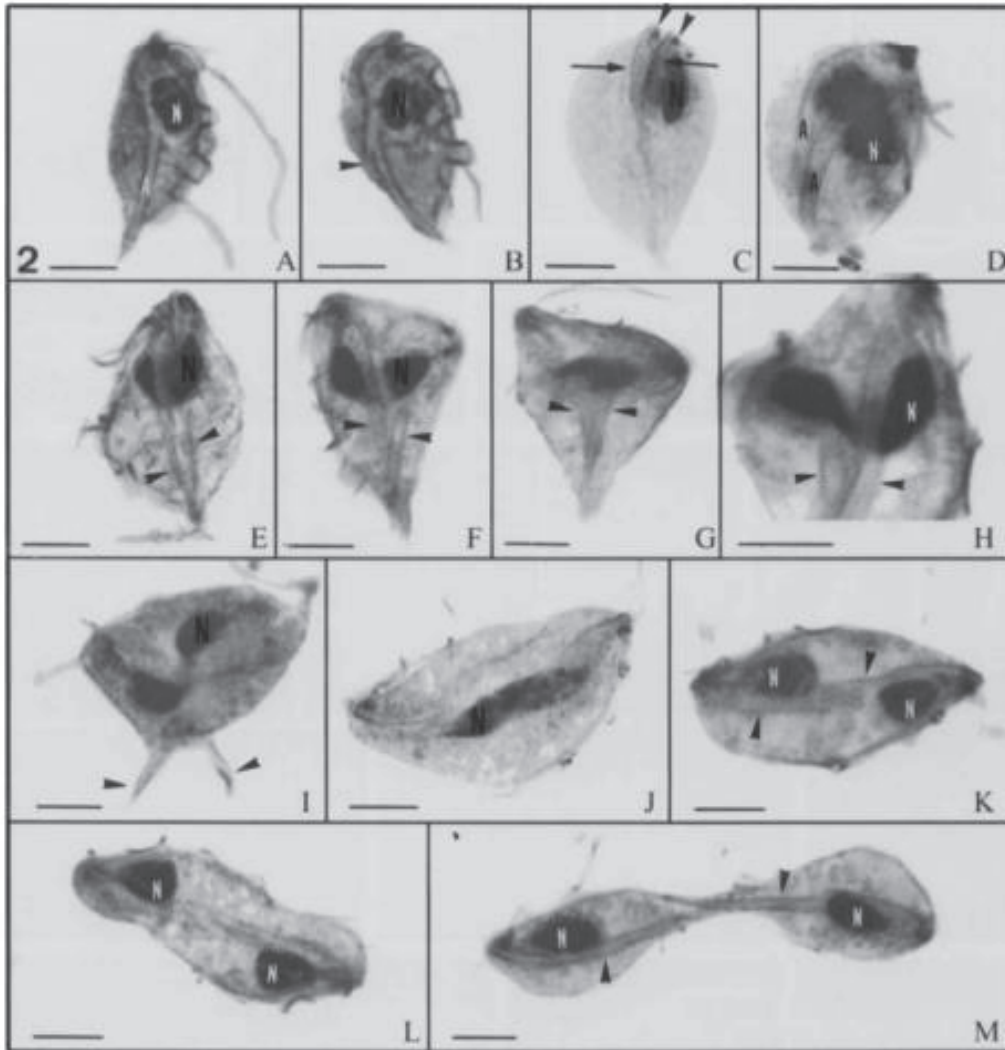
### División celular de *T. foetus*

Los trofozoítos de *T. foetus* presentan la particularidad de dividirse mediante un proceso denominado “mitosis cerrada” o “criptopleuromitosis” (Ribeiro y col., 2000; Collántes-Fernández y col., 2018). En este proceso, la envoltura nuclear permanece intacta, el huso mitótico es extranuclear; y las estructuras del citoesqueleto: pelta-axostilo, la costa y los flagelos se duplican antes del inicio de la mitosis (fase S/G2) (Ribeiro y col., 2000). Los axostilos duplicados siguen el movimiento de los cinetosomas y se separan progresivamente en la región anterior de la célula, quedando unidos en el extremo posterior. Esto hace que los axostilos se crucen, presionen el núcleo y den lugar a la cariocinesis (**Fig. 4**). A medida que

la división avanza, los dos polos celulares migran y las células hijas quedan orientadas en direcciones opuestas. La última fase de este proceso de división implica la separación celular mediante la acción de los flagelos; lo que da paso a lo que se conoce como fisión binaria longitudinal (proceso mediante el cual una célula madre duplica su material genético y se divide en dos células hijas idénticas) (**Fig. 5**) (Ribeiro y col., 2000). En este contexto, recientemente nuestro grupo de trabajo ha reportado que la fisión binaria no es la única forma de división que utilizan estos parásitos; sino que también pueden dividirse mediante fisión múltiple y dar origen, a partir de una única célula madre, a numerosas células hijas. Este proceso ocurre cuando *T. foetus* es sometido a un estrés de tipo nutricional; lo cual favorece la aparición de células multinucleadas, y a partir de las cuales se generan numerosos parásitos cuando se restablece el aporte normal de nutrientes (Iriarte y col., 2023). Cabe acotar que, dentro de estas células multinucleadas, existe una organización particular del citoesqueleto (axostilo y flagelos); el cual se mantiene en estrecha relación con cada núcleo, preparándose para llevar adelante la citocinesis final de la mitosis y el egreso (Iriarte y col., 2023; Pereira-Neves y col., 2009).



**Figura 4:** Microscopía electrónica de transmisión donde se observa el núcleo (Nu) de *T. foetus* durante la cariocinesis. Las flechas blancas indican la posición de los axostilos en el área de la constricción nuclear (A). H: hidrogenosomas.



**Figura 5:** Mitosis en *Tritrichomonas foetus*. Imágenes de microscopía de campo brillante de parásitos marcados con tinción panóptica donde pueden observarse las fases de la mitosis. **A:** Interfase; **B-C:** Pre-mitosis; **D-F:** Mitosis (fase 1); **G-H:** Mitosis (fase 2); **I-L:** Mitosis (fase 3); **M:** Mitosis (fase 4). N; núcleos. Las puntas de flecha negra marcan los axostilos. Barra A-H = 3 $\mu$ m; I-M: 2 $\mu$ m (Ribeiro y col., 2000).

## **Rol de las proteínas con motivos MORN en la división celular**

Los motivos MORN hacen referencia a sus siglas en inglés para “*membrane occupation and recognition nexus*” (ocupación de membrana y nexo de reconocimiento), se identificó por primera vez como una secuencia especial de 14 aminoácidos (Y-Q/E-G-E/Q-T-X-N-G-K-X-H-G-Y-G) en el año 2000; como resultado de la detección de un tipo de proteínas presentes en el músculo esquelético. Las proteínas que contienen estos motivos poseen una amplia distribución taxonómica y se encuentran tanto en procariotas como en eucariotas. Existen reportes que demuestran que en una proteína puede contener varios motivos MORN (de 2 a 20) y estos, a su vez, pueden encontrarse en varias posiciones, determinando diferentes funciones biológicas (Takehima y col., 2000; Saiko y col., 2020; Li y col., 2019; Im y col., 2007). Se han reportado una gran cantidad de proteínas que contienen motivos MORN en plantas, animales y protistas; y cuya función principal es la de direccionar las proteínas hacia las membranas (Zhou y col., 2022).

En plantas, hay evidencia de que las proteínas que contienen motivos MORN están involucradas en la regulación de la localización subcelular, la activación enzimática, la transducción de señales y el direccionamiento hacia las membranas (Zhou y col., 2022). Por ejemplo, en arroz, la proteína OsPIP1K1 regula la transducción de señales relacionadas con los genes de la floración y espigado (Ma y col., 2004). En *Arabidopsis thaliana*, se demostró que los motivos MORN presentes en AtPIP1K1 aumentan la actividad enzimática de PA y PIP2 (Im y col., 2007). También, se ha descrito que estas proteínas afectan el crecimiento de las plantas, el rendimiento de las semillas, la división de los cloroplastos y la proliferación celular (Shimada y col., 2004; Lee y col., 2010; Zhou y col., 2022).

En mamíferos, las proteínas con motivos MORN están involucradas en la división celular, la reproducción, la proliferación de células tumorales, el transporte de las proteínas y el desarrollo de los organismos (Zhou y col., 2022). Por ejemplo, la proteína JPH2 en mamíferos está involucrada en las funciones cardíacas tanto de embriones como de organismos adultos (Matsushita y col., 2007; De Bruijn y col., 2021; Miura y col., 2020; Landstrom y col., 2007). MORN2 y MORN3 son proteínas

presentes en testículos de ratón y se ha demostrado que poseen un rol relevante durante la espermatogénesis (Takeshima y col., 2000; Zhang y col., 2015). MORN5 se expresa en la cavidad bucal de diferentes organismos y variantes de esta proteína se asocian con un mayor riesgo de labio hendido no sindrómico en humanos (Cela y col., 2016). Las proteínas MORN3 y SET7/9 podrían estar involucradas en la proliferación de células tumorales, teniendo en cuenta que la primera es un posible regulador de la proteína antitumoral p53 (Nakada y col., 2018); y la segunda regula el ciclo celular y la apoptosis del cáncer de colon (Vasileva y col., 2020).

En parásitos, las proteínas con motivos MORN pueden localizarse en diferentes membranas plasmáticas y compartimientos celulares, desempeñando diferentes funciones (Zhou y col., 2022). En el parásito intracelular *Toxoplasma gondii*, la proteína MORN1 se localiza en el complejo interno de membranas, regula la división nuclear y celular del parásito, y mantiene la integridad de la estructura del polo celular posterior (Gubbels y col., 2006); y su supresión genera defectos en la citocinesis y desórdenes en el desarrollo (Heaslip y col., 2010). En *Trypanosoma brucei* la proteína TbMORN1 se encuentra en el cuello del flagelo y actúa como una parte fundamental del citoesqueleto, facilitando la entrada de proteínas en la bolsa flagelar (Esson y col., 2012). Además, está involucrada indirectamente en el proceso de endocitosis (Zhou y col., 2022).

Si bien el rol de las proteínas con motivos MORN está bien caracterizado en diferentes parásitos, no existen hasta la fecha estudios sobre este tipo de proteínas en *Tritrichomonas foetus*; por lo cual nos propusimos el presente plan de trabajo.

## **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 y/o múltiple dependiendo de las condiciones externas, es escaso el conocimiento existente acerca de la regulación de la división celular de este protozoario. En este contexto, nos propusimos en este trabajo de tesis la “**Caracterización de la proteína MORN3 y el análisis de su rol en la división celular de *Tritrichomonas foetus***”. Para abordar este objetivo general planteamos los siguientes objetivos específicos:

### **Objetivos Específicos**

**1-Evaluar el rol de la proteína TfMORN3 en el proceso de proliferación celular mediante ensayos de ganancia de función.** Considerando que el análisis de la cinética de crecimiento y el cálculo de las tasas de crecimiento son parámetros que permiten evaluar la eficiencia de la división celular; proponemos realizar este análisis en este objetivo con parásitos que sobreexpresan la proteína TfMORN3.

**2-Analizar si la sobreexpresión de TfMORN3 afecta la división celular de *T. foetus*.** En este objetivo planteamos analizar específicamente los parámetros relacionados al ciclo celular; tales como cantidad de núcleos, la replicación del ADN y la dinámica del citoesqueleto durante la mitosis.

## **Materiales y métodos**

### **1. Cultivo de parásitos**

Para la realización de los diferentes ensayos, los parásitos *T. foetus*, fueron cultivados *in vitro* en medio Diamond's Trypticase-yeast extract-maltose (TYM) (composición: 22,22 g/l triptona; 11,11 g/l extracto de levadura; 5,55 g/l maltosa;

1,11g/l L-cisteína; 0,22 g/l ácido ascórbico; 0,88 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,88 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; H<sub>2</sub>O destilada; pH 6,2.). Suplementado con 10% de suero fetal equino, 10 U/mL de penicilina/10 mg/mL de estreptomina (Invitrogen). Los parásitos fueron cultivados a 37°C y se mantuvieron en el tiempo mediante la realización de subcultivos diarios (Gelbart y col., 1990).

## 2. Extracción de ADN genómico de *Tritrichomonas foetus*

### 2.1 Extracción de ADN

Se extrajo ADN genómico (ADNg) de *T. foetus* partiendo de un cultivo de 15 ml de parásitos (10<sup>6</sup> parásitos/ml), los cuales se centrifugaron a 3200 rpm por 10 min, luego el pellet se resuspendió en 750 µl de UNSET Buffer (8M urea, 2 % sarkosyl (*N-Lauroylsarcosine sodium salt*), 0,15M NaCl, 0,001M EDTA, 0,1 M Tris HCl pH 7,5). Se adicionó Fenol Cloroformo-Isoamílico, se centrifugó 5 min a 5000 rpm, se recuperó la fase acuosa (que contiene el ADN) para agregarle luego 500 µl de Cloroformo-Isoamílico (24:1) y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos. Se tomó la fase acuosa y se precipitó el ADN con Isopropanol. Se dejó la muestra 30 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 5000 rpm durante 30 min, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con EtOH 70%. Se realizó una última centrifugación de 5 min a 10000 rpm para descartar el sobrenadante, se dejó secar el pellet y se resuspendió en 50 µl de 10mM Tris pH8 + ARNasa (10 µg/ml).

### 2.2 Análisis de pureza y cuantificación de la muestra de ADN

La cuantificación del ADN obtenido se realizó utilizando el equipo en el *Synergy H1* (BioTek).

El índice de contaminación del ADN con proteínas es la relación 260/280 que, en este caso es provista directamente en la medición del equipo. Un índice > a 1,8 indica que el ADN se encuentra en óptimo estado de pureza, sin contaminación de proteínas.

### 2.3 Electroforesis en gel de agarosa

La integridad de las muestras de ADN se analizó mediante una corrida electroforética en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, usando TBE 1X (TBE 10X; 4ml EDTA; 10,8 g Tris; 5,5 g Ac. Bórico, a volumen final: 2000 ml). Se realizó una dilución del ADN en H<sub>2</sub>O ultrapura para obtener la solución de trabajo (100 ng/μl en un volumen de 30 μl) conservando el stock a -20°C. La corrida se realizó en una cuba electroforética (BIORAD) a 80V por 30 minutos. Todas las electroforesis en gel de agarosa fueron visualizadas con el sistema de imagen ImageQuant LAS 500 (General Electric Healthcare).

### 3. Diseño de cebadores

La secuencia del gen que codifica para TfMORN3 la obtuvimos a partir del análisis de la base de datos del proyecto genoma de *T. foetus*; en la cual figura con el siguiente código: TRFO\_30478 (OHT02416.1). A partir de la secuencia predicha de 921 pares de bases fueron diseñados los cebadores utilizando la aplicación Primer Select del programa DNA STAR- Lasergene. Al cebador sentido (*Forward* o FW) le agregamos una secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *NdeI* (CATATG); y en el antisentido (*Reverse* o RV) agregamos una secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción *KpnI* (GGTACC), con el objetivo de facilitar el subclonado en el vector de expresión utilizado en *Trichomonas*.

**FW:** AAACCATATGATGTTTGGCGAAGAATAT

**RV:** AAAGGTACCCGATTCGTATATTTGTGAT

### 4. Amplificación de ADN

#### 4.1 Amplificación de ADN por PCR

El gen que codifica para la proteína MORN3 de *Trichomonas foetus* (TfMORN3) fue amplificado mediante PCR (“Reacción en Cadena de la Polimerasa”), utilizando como molde ADN genómico (considerando que *T. foetus* posee pocos intrones), en las siguientes condiciones: 35 ciclos de 95°C 30”; 55°C 30”; 72°C 30” en el termociclador *Mastercycler Nexus Gradient* (Eppendorf). Para



llevar adelante dicha amplificación utilizamos: 0,16  $\mu$ l de polimerasa EasyTaq, 2  $\mu$ l de Buffer EasyTaq (10X) (TransGen Biotech Co.), 0,4  $\mu$ l de dNTPs (10mM), 0,4  $\mu$ l de cebador FW, 0,4  $\mu$ l de cebador RV, 1  $\mu$ l de ADNg y 15,64  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O Ultrapura (en un volumen final de la reacción de 20  $\mu$ l).

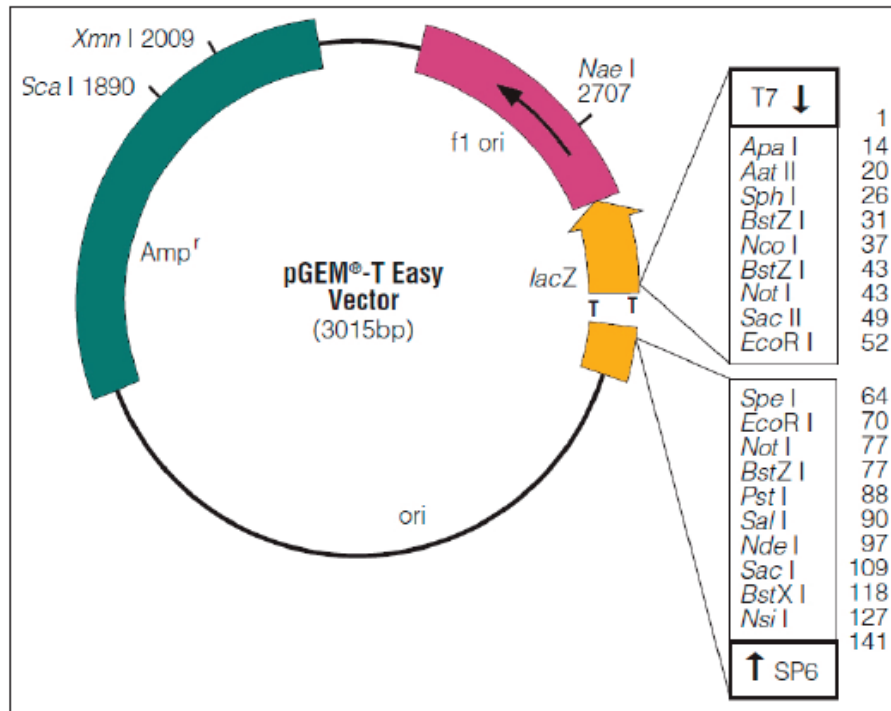
#### 4.2 Verificación del producto de amplificación obtenido

Se comprobó el tamaño del fragmento amplificado mediante una corrida electroforética en gel de agarosa al 1% utilizando buffer TBE 1X. Se sembraron 20  $\mu$ l del producto de PCR con 5  $\mu$ l de *loading* buffer (6X) para la visualización de las bandas. Paralelamente, se sembraron 3  $\mu$ l del patrón de peso molecular Ladder 1Kb plus (Invitrogen), el cual abarca el rango de fragmentos de 100-10000 pb. Se efectuó la corrida en una cuba electroforética (BIO-RAD Laboratories) por un periodo de 40 minutos a 80V. Luego se observó el gel de agarosa en un transiluminador UV. La banda correspondiente al peso molecular esperado se cortó desde el gel de agarosa y se purificó con el Kit comercial QIA Quick PCR Purificación kit-(QIAGEN).

### 5. Clonado y subclonado de TfMORN3

#### 5.1 Clonado en pGemT-Easy

El gen TfMORN3 fue clonado en el vector de clonación pGemT-Easy (Promega) (**Fig.6**). Este es un vector linealizado con una timina (T) en cada extremo 3'. Los T *overhangs* mejoran la eficiencia de ligación de los productos de PCR, evitando la recircularización del vector. El mismo además contiene un sitio de múltiple clonado dentro del gen de la  $\beta$ -galactosidasa, que permite la identificación de recombinantes mediante la inactivación insercional de la enzima (selección de blancas y azules en placa indicadora) y un gen de resistencia a Ampicilina.



**Figura 6:** Diagrama del vector de clonado pGemT-Easy

Inicialmente, realizamos una reacción de ligación con 0,5 µl de pGemT-Easy, 8µl de inserto, 1 µl de Buffer Ligasa 10X y 0,5 µl de T4 DNA ligasa y mantuvimos la reacción toda la noche a 4°C. Luego se transformaron bacterias competentes Omnimax con el producto de la ligación mediante la técnica de shock térmico: las bacterias y el producto de ligación fueron incubados en hielo (para estabilizar las membranas bacterianas). Luego de 25 minutos se transfirieron a un baño de agua a 42°C por 40 segundos y nuevamente se incubaron en hielo durante 10 minutos. Luego se agregó medio de cultivo LB (triptona, NaCl, extracto de levadura) y se incubó a 37°C durante 1 hora con la finalidad de que las bacterias se recuperen y crezcan.

Se prepararon entonces placas con LB-agar, Ampicilina como marcador de selección, X-Gal (sustrato de la β-galactosidasa) e IPTG (inductor del promotor de la β-galactosidasa). Estos últimos dos fueron utilizados para poder distinguir entre las colonias recombinantes que incorporaron el inserto (blancas) de las no

recombinantes (azules). Se plaquearon las bacterias y se las dejó crecer durante toda la noche a 37°C.

### 5.2 Análisis de las colonias recombinantes mediante Colony-PCR

Para este análisis se tomaron las colonias recombinantes (blancas) y realizamos una Colony-PCR para seleccionar los clones positivos. La PCR se diseñó para la amplificación del inserto con el cebador *Forward* T7 (que hace *annealing* con la secuencia del promotor de T7 en pGemT-Easy) y el cebador *reverse* que se utilizó para amplificar la secuencia de TfMORN3. La Mix se preparó utilizando 9,3 µl de H<sub>2</sub>O Ultrapura, 1,50 µl de Buffer 10X, 1 µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1 µl de dNTPs (250 µl/10mM), 0,5 µl de cebador Forward (10 µM), 0,5 µl de cebador Reverse (10 µM) y 0,2 µl de Taq DNA polimerasa (1 U). La amplificación se realizó en un termociclador modelo *Master cycler Gradient* (Eppendorf).

### 5.3 Verificación de los productos obtenidos mediante Colony-PCR

Comprobamos mediante este método si las colonias recombinantes tenían el inserto realizando una corrida electroforética en gel de agarosa (sección 2.3) sembrando 15µl del producto de PCR.

### 5.4 Mini-prep de las colonias conteniendo el inserto TfMORN3

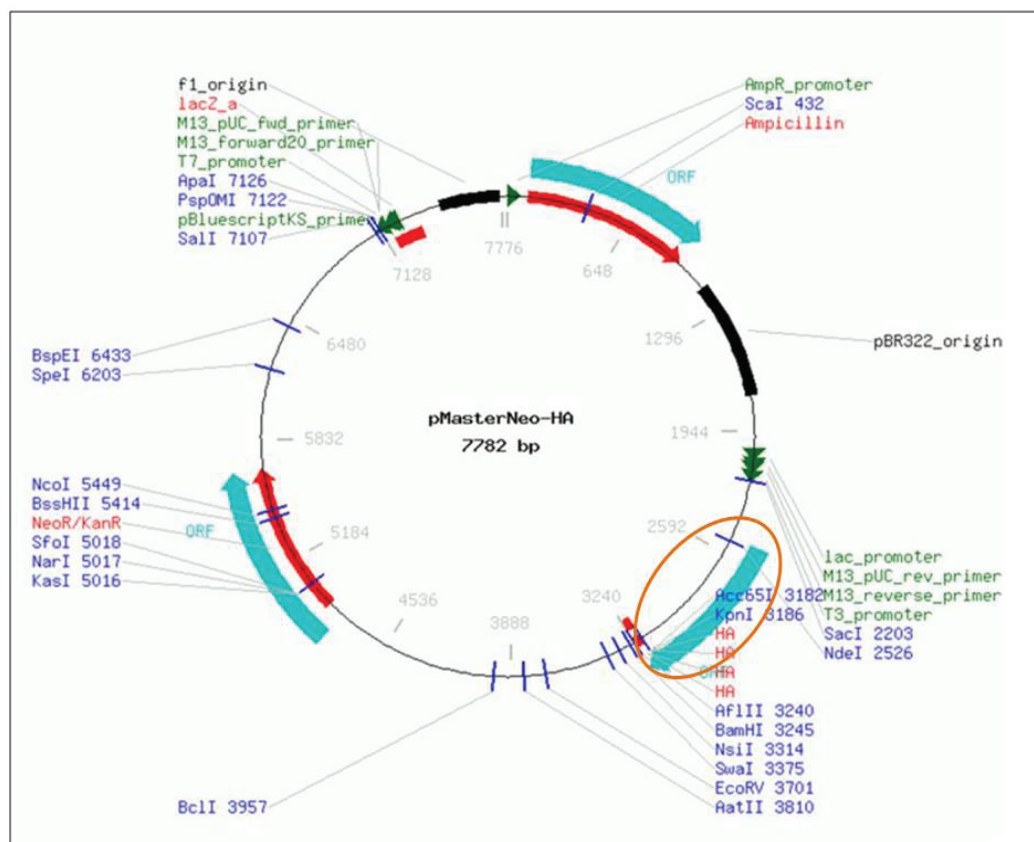
Las colonias que resultaron positivas para la colony-PCR fueron crecidas en 3 mL de LB durante toda la noche a 37°C; al día siguiente se les extrajo el ADN plasmídico por el método de Mini-prep con el kit comercial *Gen Elute™HP Plasmid Miniprep Kit* (Sigma-Aldrich), siguiendo el protocolo del fabricante.

### 5.5 Subclonado de TfMORN3 en el vector de expresión de trichomonas

Para este objetivo realizamos una digestión secuencial con las enzimas de restricción cuyas secuencias flanquean al gen TfMORN3 (*KpnI* y *NdeI*), para obtener el inserto que luego sería ligado al vector de expresión de *Trichomonas*. Los

volúmenes utilizados en la reacción de digestión fueron los siguientes: 24,5 µl de H<sub>2</sub>O Ultrapura, 10 µl del producto de Mini-prep. 4 µl de Buffer NEB 1 (10X), 0,5 µl de BSA y 1 µl de enzima de restricción cada vez. Se realizó luego una corrida electroforética en gel de agarosa (Ídem a la sección 2.3) sembrando los 40µl del producto de digestión. La banda correspondiente al peso molecular esperado se cortó desde el gel de agarosa y se purificó con el Kit comercial *QIA Quick PCR Purification kit* (QIAGEN).

El subclonado se realizó en el vector de expresión pMasterNeo-(HA) (**Fig. 7**) bajo el control de un promotor fuerte ( $\alpha$ -SCS) de *T. vaginalis*. Dicho plásmido contiene además el gen de neomicina fosfotransferasa (Neo) que permite su selección con el antibiótico Geneticina (G418) y la ventaja de poder expresar el gen seleccionado fusionado a una etiqueta HA en su porción C-terminal (Delgadillo *et al.*, 1997). El inserto ingresa en el vector en el ORF2 (señalado con un ovalo rojo en la Figura 7).



**Figura 7:** Diagrama del vector de expresión de *Trichomonas* pMasterNeo-HA

## 5.6 Digestión y desfosforilación del vector de expresión pMasterNeo-HA

Al vector se le realizó previamente la digestión con las enzimas *KpnI* y *NdeI* para que el inserto se una a los extremos cohesivos que dejaron las enzimas; luego se realizó la desfosforilación para evitar que los extremos cohesivos vuelvan a religarse, esto se realizó preparando la siguiente mix ó mezcla: en un tubo *ependorf*: 15 µl de pMasterNeo-HA, 2 µl de Tampon Rapid Alkaline Phosphatase (10X), 2 µl de H<sub>2</sub>O Ultrapura y 1 µl de Rapid Alkaline Phosphatase. La reacción se incubó durante 30 min a 37°C (para permitir la desfosforilación) y luego se inactivó durante 2 minutos a 75 °C.

## 5.7 Ligación de TfMORN3 al vector de expresión pMasterNeo-HA

Se utilizó el vector linealizado para ligar al inserto de TfMORN3 purificado. La ligación se realizó en una relación vector:inserto de 1:9 (0,7 µl del vector y 7,8 µl del inserto) adicionando al tubo de la reacción 1µl de Buffer Ligasa 10X y 0,5 µl de T4 ADN ligasa, en un volumen final de 10µl; y transcurrió la ligación toda la noche a 4°C. Una vez obtenida la ligación se transformaron bacterias competentes Omnimax siguiendo el protocolo ya explicado en la sección 5.1; se dejaron crecer las bacterias durante toda la noche a 37°C y luego fueron plaqueadas en medio LB-agar-Ampicilina. Se seleccionaron clones y se procedió a la extracción de los ADN plasmídicos mediante la técnica de Mini-prep con el kit comercial *Gen Elute HP Plasmid Miniprep Kit* (Sigma-Aldrich) siguiendo el protocolo del fabricante. Se chequeó mediante digestión con las enzimas de restricción que reconocen la secuencia de los fragmentos flanqueantes a TfMORN3, es decir, *KpnI* y *NdeI*, la presencia del inserto TfMORN3 en las colonias seleccionadas. Las colonias positivas se enviaron a secuenciar para finalmente confirmar la identidad del inserto.

## 6. Transfección de parásitos con el constructo TfMORN3-pMasterNeo-HA

### 6.1 Midi-prep de los clones recombinantes

Los clones de las bacterias recombinantes TfMORN3-MasterNeo- HA, fueron crecidas en 150 ml de medio LB-Ampicilina a 37°C toda la noche. Al día siguiente se realizó la extracción de ADN plasmídico por el método de Midi-prep con el kit comercial *Genopure Plasmid Midi Kit* (Roche) y se realizó la cuantificación del plásmido obtenido.

## 6.2 Transfección de parásitos

Se transfectaron *T. foetus* de la cepa K con el plásmido TfMORN3-MasterNeo-HA, mediante electroporación. En paralelo, también se transfectaron parásitos con el plásmido Master Neo vacío (EpNeo) para ser utilizado como control negativo en los experimentos. Para realizar este proceso, 300 µl 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 µg de ADN plasmídico. Las condiciones del electroporador fueron las siguientes: 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. Los mismos se incubaron por 4 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo se les agregó 100 µg/mL de G418 (Sigma) como agente de selección y se incubaron durante toda la noche. Pasado este tiempo, se tomaron 40ml de cada tubo (evitando los parásitos muertos presentes en los precipitados de los fondos de los tubos) y se los trasvasó a tubos estériles. Estos tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos, se descartaron los sobrenadantes y se resuspendieron los pellets en 50 ml de medio TYM complementado con suero fetal equino y 100 µg/mL de G418.

## 7. Ensayo de crecimiento de parásitos

Se realizaron las curvas de la cinética de crecimiento de los parásitos transfectados con EpNeo y parásitos sobreexpresando la proteína TfMORN3. Para esto se inocularon  $1 \times 10^5$  trofozoítos en 8 ml de medio TYM, y se incubaron a 37°C durante 72 hs. Después de la inoculación, se registraron los recuentos celulares en

los siguientes momentos: 24 hs, 48 hs y 72 hs utilizando una cámara de Neubauer. Las tasas de crecimiento se determinaron como 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. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

#### 8. Tinción de núcleos

El número de núcleos por célula se determinó utilizando la tinción con DAPI (6-diamidino-2-fenilindol). Los parásitos 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 en PBS 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 microscopio utilizando un medio de montaje de fluoromount. Los ensayos fueron realizados por triplicado y analizados en un Zeiss Axio Microscopio de fluorescencia invertida Observer 7 (Zeiss). Para el procesamiento de imágenes se utilizó Adobe Photoshop (Adobe Sistemas).

#### 9. Inmunolocalización

Los parásitos cultivados en diferentes condiciones se incubaron a 37°C sobre cubreobjetos de vidrio durante 4 hs y luego se fijaron y permeabilizaron en metanol frío durante 10 min. Las células fueron lavadas y bloqueadas con suero fetal bovino (SFB) al 5% en PBS durante 30 min, y se incubó durante la noche con el anticuerpo primario diluido en PBS más SFB al 2%. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-HA (1:500) (Covance) y anti- $\alpha$ tubulina (1:500). Los cubreobjetos se lavaron con PBS y luego se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente (RT) con una dilución 1:5000 de anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor (Molecular sondas). Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos de microscopio utilizando el reactivo ProLong Gold con DAPI o 4',6-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 Adobe Photoshop (Adobe Sistemas).

#### 10. Citometría de flujo

Para determinar el contenido de ADN y el tamaño celular de los parásitos, se cultivaron los mismos hasta alcanzar una densidad de  $2 \times 10^6$  células/ml, se recogieron por centrifugación y se lavaron con 5 ml de PBS frío. Luego se fijaron agregando 300  $\mu$ l de PBS y 5ml de etanol al 100% frío gota a gota y vortexeando. En esta condición se incubaron durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, cada muestra fue lavada con 1 ml de PBS 2% vol/vol de suero fetal equino (SE), se resuspendieron en 1 ml de PBS 2% de SE y 180  $\mu$ g/ml de ARNasa A y fueron incubadas por 30 minutos a 37°C.

Luego, las muestras fueron teñidas con una solución de ioduro de propidio (IP) 25 mg/ml, e incubadas durante 30 minutos a 37°C antes del análisis con un citómetro de flujo. El análisis de citometría de flujo 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 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.

#### 11. Adhesión de parásitos

Los ensayos de adhesión de los parásitos (EpNeo y TfMORN3-pMasterNeo-HA) se realizaron utilizando células epiteliales prepuciales bovinas. Dichas células se obtuvieron mediante raspaje de la cavidad prepucial de un toro, luego se resuspendieron en 50 ml de PBS tibio (37 °C) (pH 7,2) justo antes de los

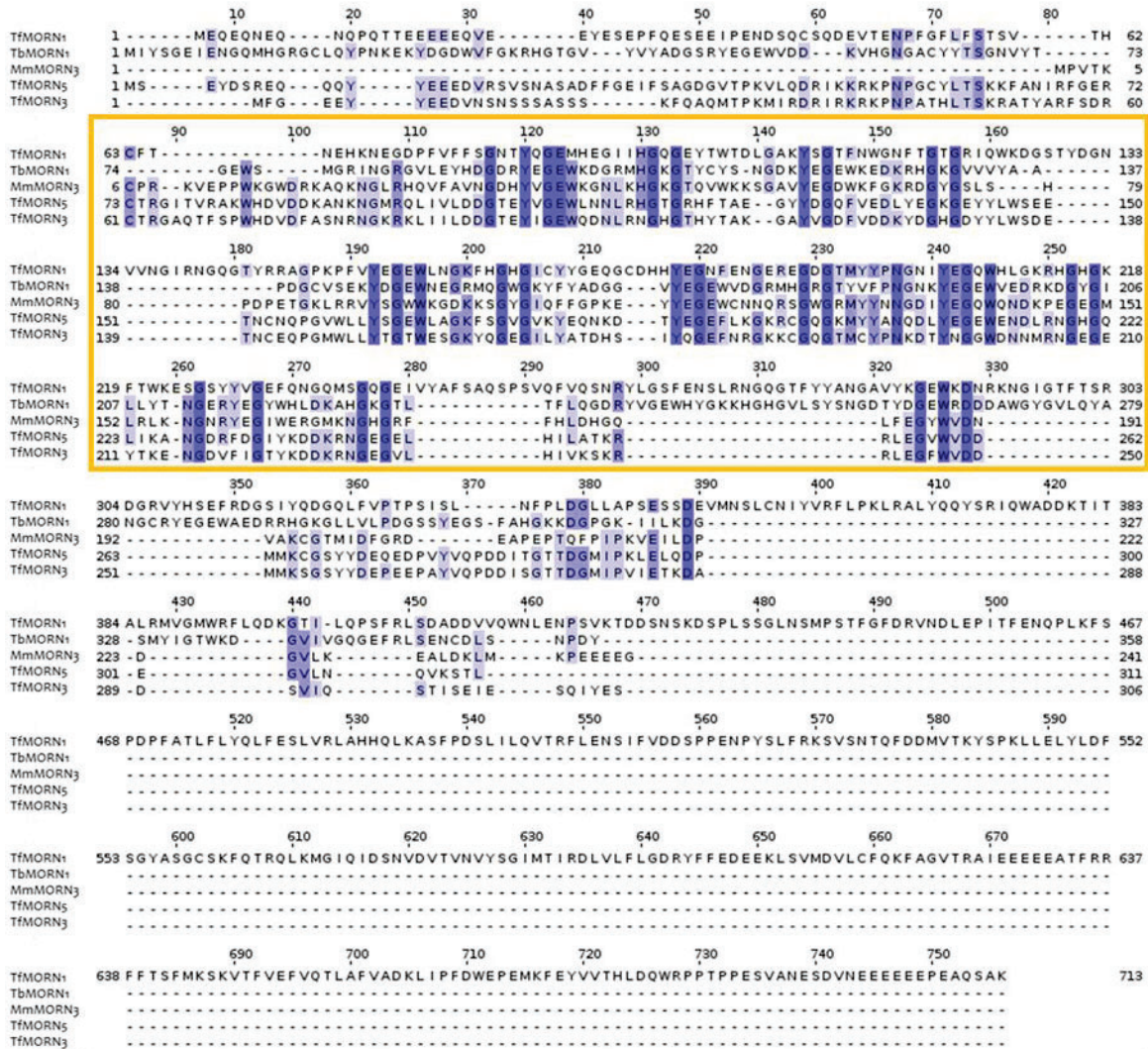


experimentos. A continuación, se lavaron dos veces en PBS tibio mediante centrifugación a 400 xg durante 5 minutos, se suspendieron hasta una densidad celular de  $10^5$  células/ml en PBS tibio y se usaron inmediatamente para ensayos de interacción. Las células se incubaron conjuntamente con *T. foetus*, respectivamente, en una relación celular de 3:1 de parásito:célula hospedadora en PBS con suero fetal bovino al 1 % a pH 6,5, a 37°C durante 30 min. Antes de la coincubación, los parásitos se marcaron previamente con Cell Tracker Red (Invitrogen). Posteriormente, las coincubaciones se lavaron 3 veces con PBS para eliminar los parásitos no adheridos, se fijaron con formaldehído al 4% (Polysciences, Inc) y se montaron en portaobjetos con medio de montaje Fluoromont (Sigma). Los parásitos rojos adheridos a las células hospedadoras se visualizaron y se cuantificaron utilizando un microscopio Zeiss Axio Observer 7 (Zeiss). Los ensayos se realizaron 3 veces y por triplicado.

## Resultados

### **Proteínas con motivos MORN en *T. foetus***

Inicialmente realizamos una búsqueda de proteínas que contenían el dominio MORN en el genoma de *T. foetus* de la cepa K y e identificamos los siguientes 3 candidatos: TRFO\_32070 MORN *repeat containing* (a la cual denominamos TfMORN1), TRFO\_30478 MORN *repeat-containing protein 3* (a la cual denominamos TfMORN3) y TRFO\_14057 MORN *repeat-containing protein 5* (a la cual denominamos TfMORN5). Luego realizamos un alineamiento múltiple de secuencias para determinar el porcentaje de identidad entre las secuencias de *T. foetus*, y con otras secuencias conocidas y previamente caracterizadas (*T. brucei* MORN1 (XP\_011774256.1), *M. musculus* MORN3 (NP\_083388.1). Los porcentajes de identidad obtenidos fueron los siguientes: TfMORN1/ TfMORN3= 23,16%; TfMORN1/ TfMORN5= 26,91%; TfMORN3/TfMORN5= 57,53%. Los porcentajes de identidad al analizar TbMORN1/TfMORN1, MmMORN3/TfMORN5, MmMORN3/TfMORN3; fueron 28,79%, 37,23% y 30,25%, respectivamente (**Fig. 8**). El objetivo de nuestro grupo de trabajo es caracterizar las tres proteínas con motivos MORN identificadas en *T. foetus*; en este contexto en el presente trabajo decidimos abordar el estudio en profundidad de la TRFO\_30478 MORN *repeat-containing protein 3* de *Tritrichomonas foetus* (TfMORN3).

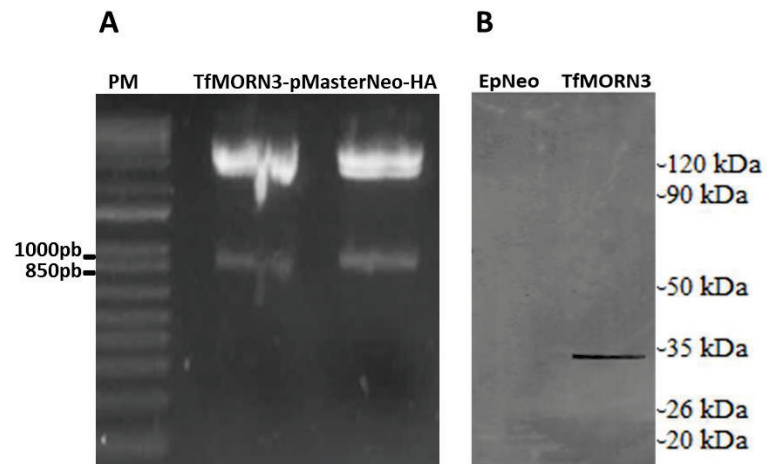


**Figura 8: Alineamiento múltiple de secuencias de proteínas con motivos MORN.** En la figura se muestran secuencias de proteínas conocidas que contienen motivos MORN en *T. brucei* (XP\_011774256.1), *M. musculus* (NP\_083388.1); y las predichas para *T. foetus*: TfMORN1, TfMORN3 y TfMORN5. El alineamiento se obtuvo con el programa Clustal Omega, utilizando la interfaz de la página Uniprot: <https://www.uniprot.org/align>. La intensidad de los colores es relativa a los porcentajes de identidad (> 30%). El recuadro de color naranja señala la región con mayor identidad entre secuencias.

## La proteína MORN3 presenta localización citosólica en *T. foetus*

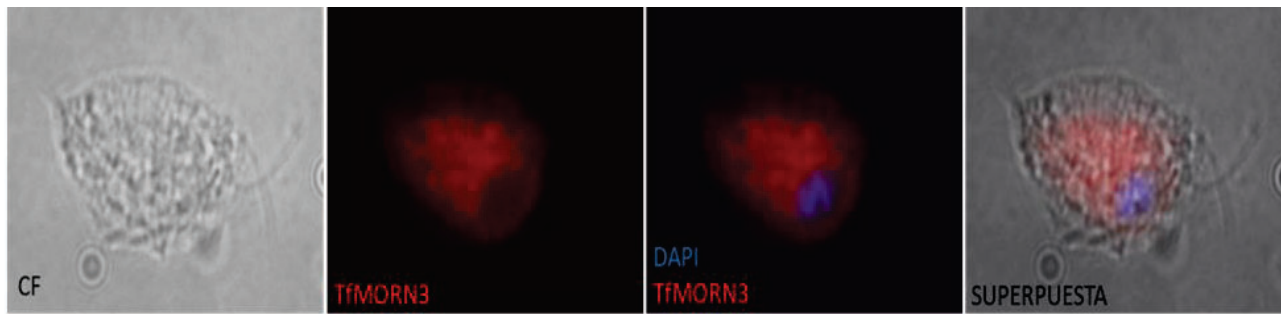
Para analizar el rol de la MORN3 en *T. foetus* optamos por llevar adelante un ensayo de sobreexpresión de dicha proteína en estos parásitos. Inicialmente, con el fin de obtener la secuencia codificante para la proteína TfMORN3, realizamos una extracción de ADN genómico de *T. foetus* salvajes (cepa K); a partir del cual realizamos la amplificación por PCR utilizando los cebadores específicos. Luego analizamos el producto de la reacción mediante una corrida electroforética y determinamos la presencia de un producto del tamaño acorde al esperado de 921pb. Luego el producto de PCR fue clonado en el vector pGemT®-Easy (Promega), la ligación realizada se utilizó para transformar bacterias competentes; y luego chequeamos la presencia del inserto mediante colony PCR. Finalmente realizamos un análisis de secuenciación (Macrogen) para confirmar la obtención correcta del constructo. A continuación, realizamos la digestión del plásmido TfMorn3-pGemT®-Easy con las enzimas *NdeI* y *KpnI*, que cortan a 5' y a 3' del gen de Morn3, respectivamente, para liberar el fragmento de interés; el cual fue subclonado en el vector de expresión en tricomonas pMasterNeo-(HA). El vector de expresión pMasterNeo-(HA) presenta la particularidad de expresar el gen de interés bajo la regulación de un promotor fuerte ( $\alpha$ -scs); y además contiene una etiqueta HA (hemaglutinina) en su extremo C-terminal, lo que permite hacer el seguimiento de la proteína de interés. Para chequear la presencia de clones positivos realizamos digestiones con las enzimas de restricción *NdeI* y *KpnI*, y analizamos el producto de la digestión mediante una corrida electroforética en un gel de agarosa 1%. Pudimos constatar la presencia de los fragmentos del tamaño correspondiente al inserto de interés de 921 pb, en dos de los clones analizados (**Fig. 9A**). Luego, parásitos *T. foetus* de la cepa K fueron transfectados con el constructo obtenido, y como control se transfectaron parásitos con el vector vacío (TfEpNeo). Posteriormente, determinamos la eficiencia de transfección y/o sobreexpresión, mediante un ensayo de Western blot utilizando un anticuerpo anti-HA. En la **Figura 9B** podemos observar en el lisado proteico total de parásitos TfMORN3 una banda de peso

molecular de alrededor de 34 kDa, la cual coincide con el tamaño esperado para TfMORN3.



**Figura 9: Obtención de los parásitos TfMORN3.** **A.** Corrida electroforética en gel de agarosa del producto de la digestión con enzimas de restricción del constructo TfMORN3-pMasterNeo-(HA). Carril 1: marcador de peso molecular; carriles 2 y 3: productos de las digestiones donde puede observarse una señal acorde al tamaño esperado en ambos casos (921pb). **B.** Western blot de extractos proteicos totales de TfMORN3 y parásitos TfEpNeo utilizando el anticuerpo anti-HA, donde puede observarse una señal del tamaño esperado de alrededor de 34kDa, en el carril correspondiente a los parásitos TfMORN3.

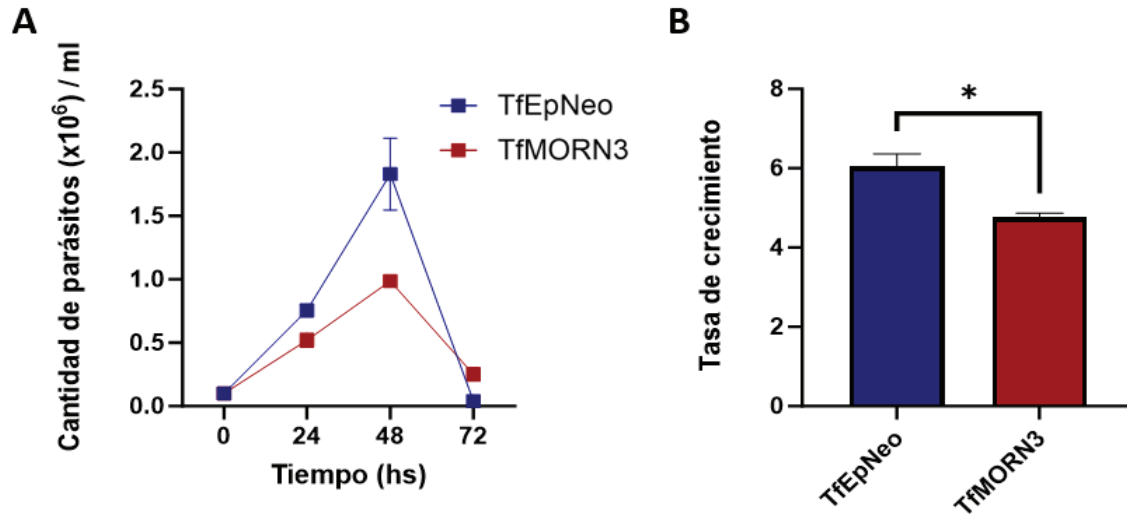
Una vez obtenidos los parásitos TfMORN3, evaluamos la localización subcelular de esta proteína en estos parásitos mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI), utilizando el anticuerpo anti-HA. Luego observamos las muestras en el microscopio de epifluorescencia. Pudimos determinar que TfMORN3 presenta localización citosólica en estos parásitos (**Fig. 10**).



**Figura 10. Localización subcelular de TfMORN3.** Imagen representativa del ensayo de Inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo primario anti-HA, donde puede observarse la localización citosólica (y la ausencia de señal nuclear) de TfMORN3. TfMORN3: parásitos transfectados con TfMORN3- pMasterNeo-HA. CF: contraste de fase. El núcleo fue teñido con DAPI (azul).

### La sobreexpresión de TfMORN3 altera el crecimiento normal de los parásitos

Teniendo en cuenta el rol que tienen algunas proteínas MORN en otros organismos, específicamente en la proliferación celular; analizamos si la sobreexpresión de TfMORN3 tenía alguna influencia en el crecimiento normal de los parásitos. Para ello, realizamos curvas de crecimiento comparando los parásitos TfEpNeo y los parásitos TfMORN3. En dicho experimento pudimos observar que ambas poblaciones de parásitos alcanzaron su máximo crecimiento a las 48hs, pero en el caso de los TfMORN3, éstos alcanzaron una densidad máxima 54% menor que los parásitos TfEpNeo (**Fig. 11A**). Cuando calculamos las tasas de crecimiento de ambas poblaciones, pudimos observar que la tasa de crecimiento de los parásitos TfMORN3 fue significativamente menor que la tasa de crecimiento de aquellos parásitos TfEpNeo (**Fig. 11B**); siendo el valor medio de la tasa de crecimiento para TfEpNeo de 6,04, y el de TfMORN3 de 4,77. Estos resultados obtenidos nos estarían sugiriendo que la proteína TfMORN3 estaría involucrada en el proceso de proliferación de este protozooario.



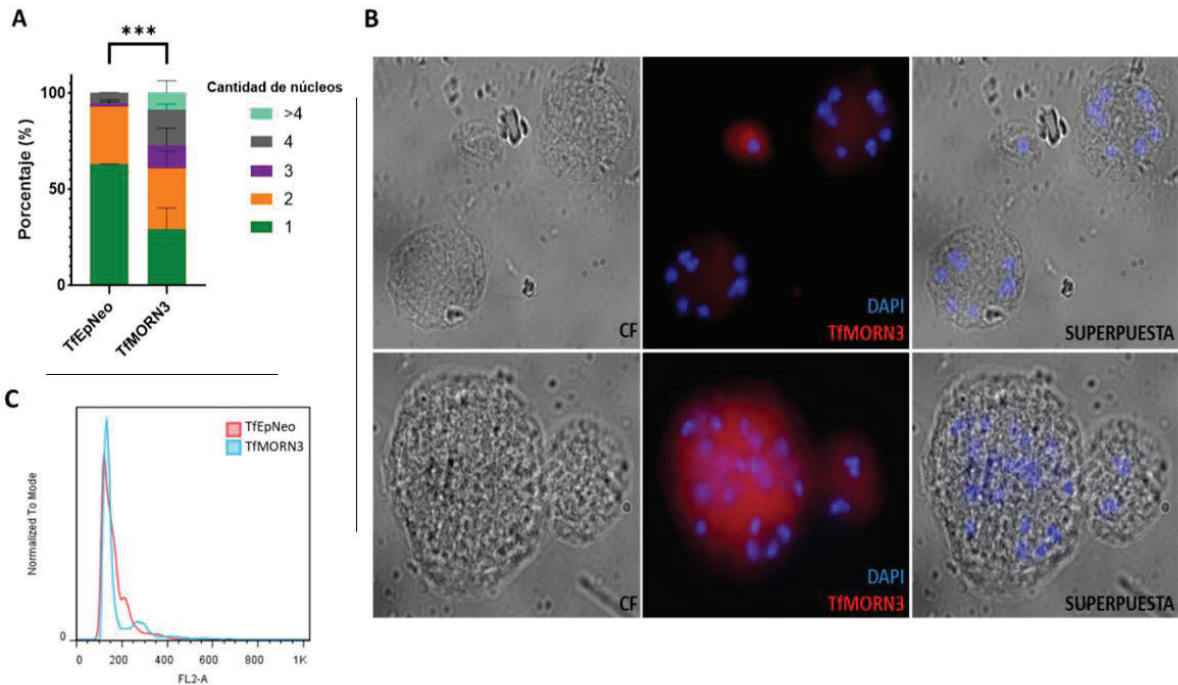
**Figura 11. Análisis del crecimiento de parásitos TfMORN3.** **A.** Curva de crecimiento donde se comparan las cinéticas de crecimiento de los parásitos TfEpNeo (azul) y TfMORN3 (rojo). En el gráfico se observa el número de parásitos (eje Y) en relación con el tiempo (eje X). **B:** Cálculo de las tasas de crecimiento de parásitos TfEpNeo (azul) y TfMORN3 (rojo). Los resultados representan la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan las desviaciones estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas entre ambas poblaciones de parásitos, analizadas mediante ANOVA (\* p-valor < 0,05).

### Los parásitos TfMORN3 presentan mayor cantidad de núcleos por parásito

Teniendo en cuenta las diferencias observadas en el crecimiento entre los parásitos TfEpNeo y TfMORN3 y que estas diferencias podrían deberse a fallas en la cariocinesis ó la citocinesis del ciclo celular; lo cual podría evidenciarse en una variabilidad en la cantidad de núcleos por célula presentes, analizamos el número de núcleos en ambas poblaciones de parásitos. Con este fin, parásitos TfEpNeo y parásitos TfMORN3 fueron teñidos con DAPI para posteriormente cuantificar los núcleos mediante microscopía de epifluorescencia. Al analizar los parásitos control (TfEpNeo), pudimos determinar que la mayoría de estos parásitos contenían un solo núcleo (63%), el 30% presentaba dos núcleos, un porcentaje menor de éstos contenía tres núcleos (1%); y el 6% restante presentaba cuatro núcleos; no observándose parásitos con más de cuatro núcleos durante este análisis (**Fig. 12A**). Al analizar los parásitos TfMORN3, observamos que el 29% de los mismos

presentaban un solo núcleo, el 32% presentaba dos núcleos, el 11,5% tres núcleos, el 19% cuatro núcleos y el 8,5% restante contaba con más de cuatro núcleos (curiosamente encontramos parásitos conteniendo más de 10 núcleos) (**Fig. 12A, B**). Estos resultados demuestran que los parásitos que sobreexpresan la proteína TfmORN3 presentan alguna alteración durante la mitosis, específicamente en la citocinesis final que origina a las células hijas. Teniendo en cuenta la alteración en la división celular observada previamente; y una publicación de nuestro grupo de trabajo que demuestra que estos parásitos son capaces de replicar su ADN independientemente si ocurre ó no la citocinesis celular (proceso denominado endoreplicación del ADN); analizamos el contenido de ADN de los parásitos TfmORN3 con el propósito de establecer, si existía una correlación entre la mayor cantidad de núcleos observada en esta población y el contenido de ADN. Los resultados fueron los siguientes: parásitos TfePNeo con 1 contenido de ADN (1C): 78,95%; con 2C: 17,60% y con >2C: 3,45%; en los parásitos TfmORN3 con 1C: 77,55%; 2C: 15,55% y >2C: 6,90%. Este análisis demuestra que la población de parásitos TfmORN3 cuenta con una mayor cantidad de parásitos con >2C; lo cual concuerda con la multinuclearidad observada previamente en esta población (**Fig. 12C**).



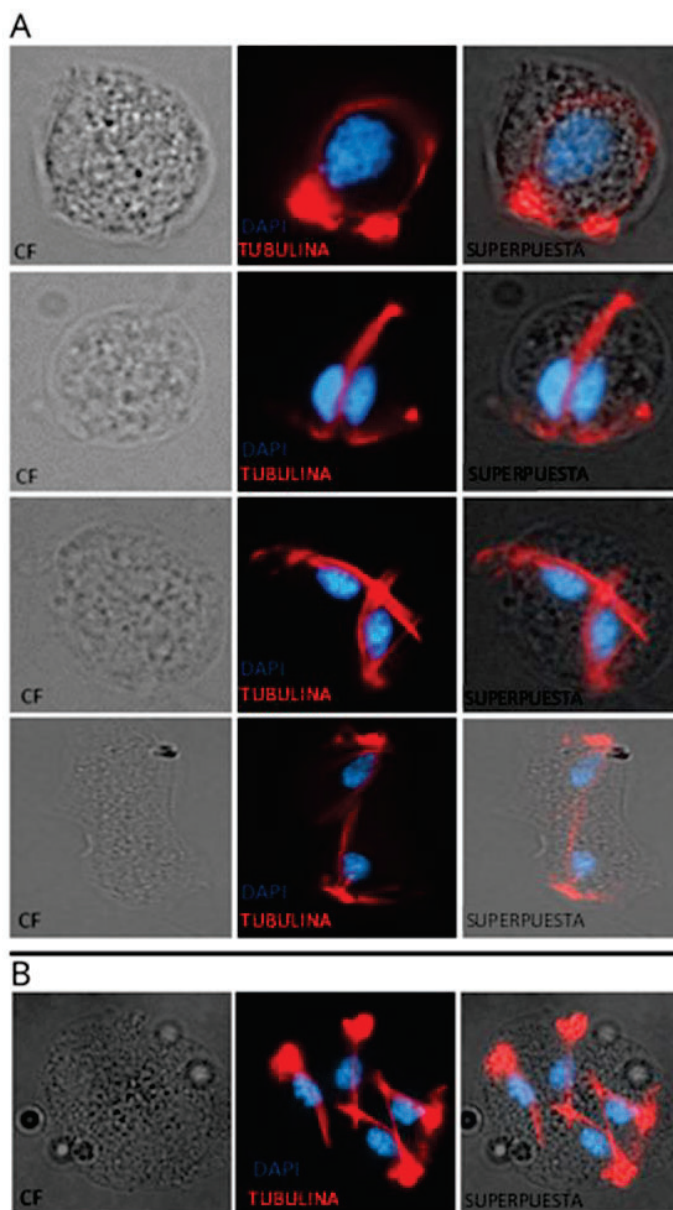


**Figura 12. Análisis de la cantidad de núcleos presentes en TfEpNeo y TfMORN3. A.** Cuantificación del contenido de núcleos por parásito mediante la tinción con DAPI. Se muestran los porcentajes de parásitos EpNeo y con TfMORN3 con 1, 2, 3, 4 ó más de 4 núcleos. Cien parásitos de cada población fueron contados por triplicado en tres experimentos independientes. Los resultados representan la media de tres experimentos independientes. La significancia estadística se probó mediante la prueba de Chi-cuadrado (\*\*\*) p-valor < 0, 0001). **B.** Imágenes representativas de inmunofluorescencia, de las células multinucleadas presentes en TfMORN3. El núcleo fue teñido con DAPI (azul). En color rojo, TfMORN3-HA. CF: contraste de fase. **C.** Análisis del contenido de ADN mediante citometría de flujo de parásitos TfEpNeo y TfMORN3.

### Los parásitos TfMORN3 exhiben los axostilos desordenados

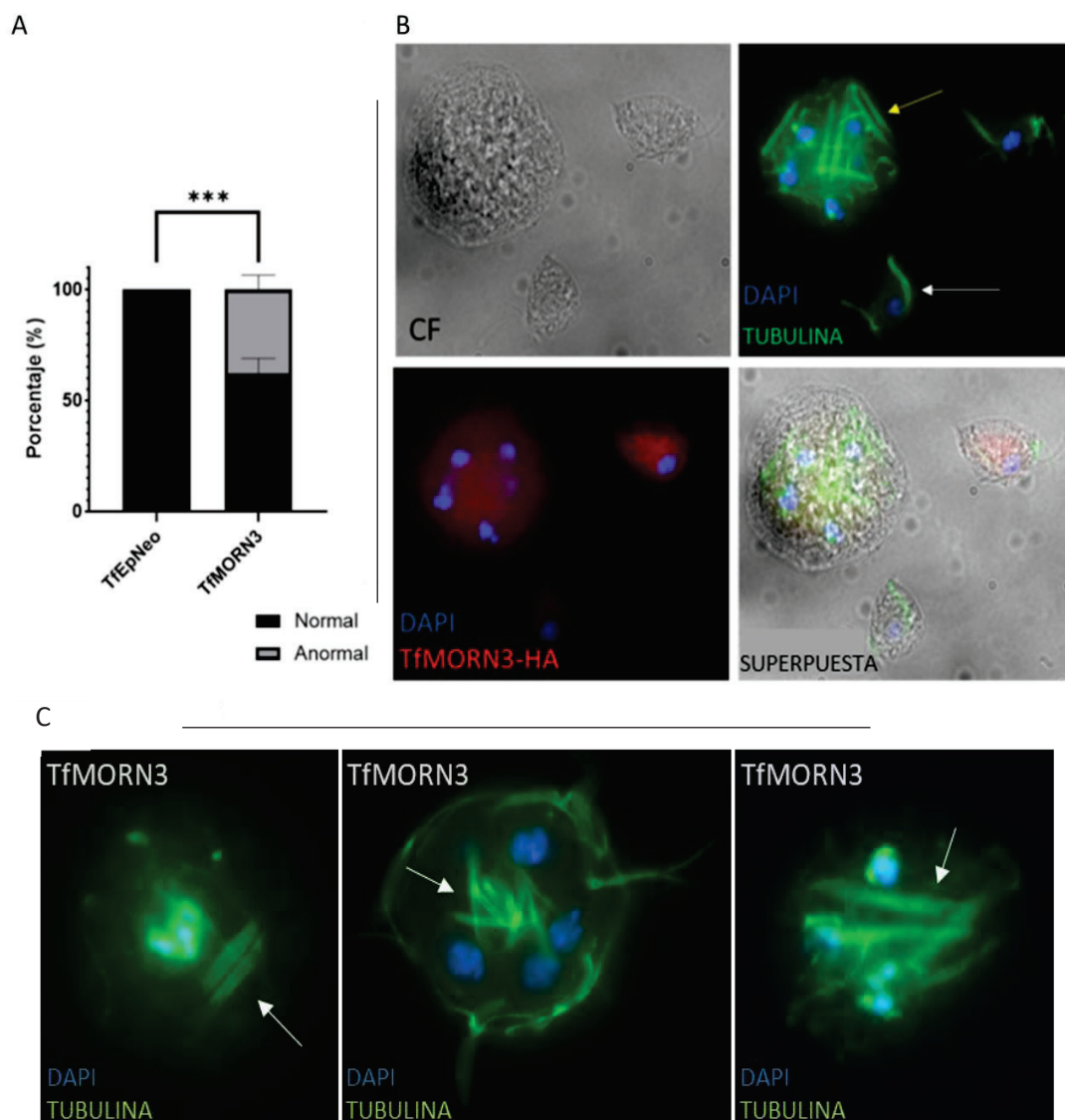
Considerando el rol activo del citoesqueleto en la división celular de *T. foetus*; específicamente en la citocinesis final que origina a las células hijas, analizamos la localización del citoesqueleto en parásitos TfMORN3. Para ésto, realizamos una inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo anti-HA para visualizar

TfMORN3, y un anticuerpo anti- $\alpha$  tubulina para visualizar la tubulina presente en el citoesqueleto. Como control, analizamos la localización del complejo pelta-axostilo en parásitos salvajes (**Fig. 13**), donde se puede observar que la pelta y el axostilo forman una hendidura que alberga al núcleo y a los cuerpos parabasales (Collántes-Fernández y col., 2018; Benchimol., 2010); siendo la relación de axostilo y núcleo de 1:1, tanto en células mononucleadas en división (**Fig. 13A**), como en las células que presentan más de 2 núcleos en condiciones normales de cultivo; acorde a lo observado por Iriarte y col., 2023 (**Fig. 13B**).



**Figura 13. Localización del citoesqueleto durante la división celular de *T. foetus*. A.** Inmunofluorescencia indirecta de *T. foetus* salvajes, donde puede observarse el posicionamiento y la relación de los núcleos y de los axostilos, durante los diferentes estadios de la división celular en parásitos mononucleados. **B.** Inmunofluorescencia indirecta comparando posición de núcleos y axostilos en células con mayor cantidad de núcleos. En A y B los axostilos se marcaron con el anticuerpo anti- $\alpha$ tubulina (rojo). En todos los casos el núcleo fue teñido con DAPI (azul). CF: contraste de fase.

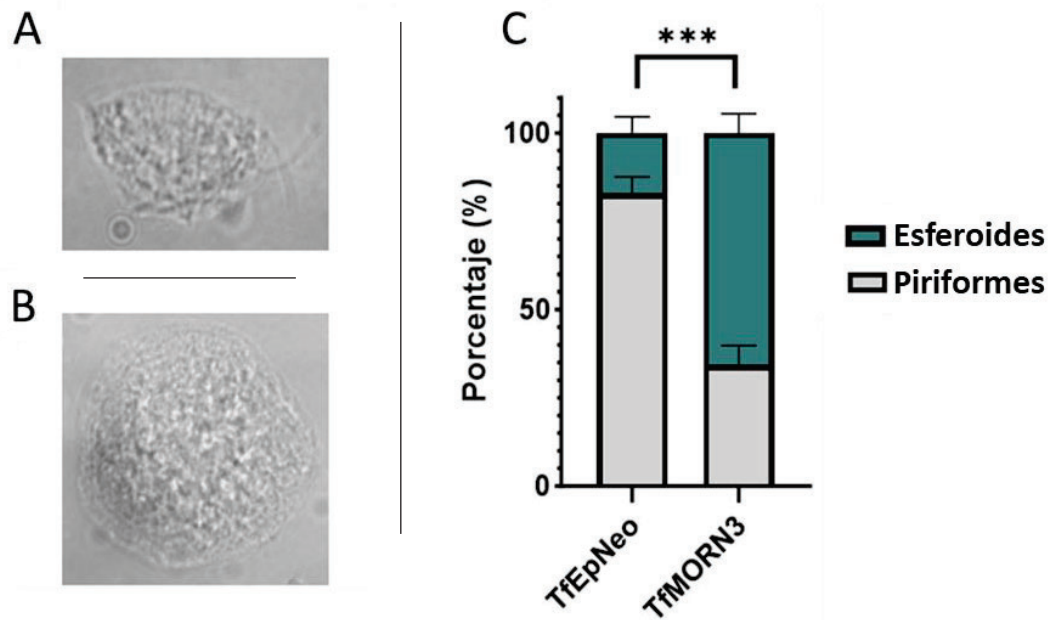
En el presente análisis, observamos que en los parásitos TfEpNeo todos los axostilos se encontraban posicionados en estrecho contacto con los núcleos, que mantenían la relación núcleo/axostilo de 1:1, y que mostraban la curvatura clásica de los axostilos; condición que consideramos como ubicación “normal” del axostilo. Al analizar los parásitos TfMORN3, determinamos que el 38% presentaban “axostilos anormales” (**Fig. 14A**); o sea que no mantenían el contacto estrecho con el núcleo, no mostraban la curvatura clásica y no presentaban la relación clásica de núcleo/axostilo de 1:1 (**Fig. 14B-C**).



**Figura 14. Posición del axostilo en parásitos TfMORN3.** **A.** Recuento de parásitos TfEpNeo y TfMORN3 con axostilos “normales” y “anormales”. En el gráfico se muestra el porcentaje de parásitos con axostilos correcta e incorrectamente posicionados (normales/anormales). La significancia estadística se probó mediante la prueba de Chi-cuadrado (\*\*p < 0,0001). **B.** Inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo primario anti-HA para visualizar TfMORN3-HA (rojo) y el anticuerpo anti –  $\alpha$  tubulina para observar los axostilos (verde). La flecha amarilla indica axostilos “anormales” y la flecha blanca indica un axostilo “normal”. **C.** Inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo primario anti –  $\alpha$  tubulina para observar los axostilos (verde). Las flechas blancas indican los axostilos. CF: contraste de fase. En todos los casos el núcleo fue teñido con DAPI (azul).

### Los parásitos TfMORN3 presentan forma redondeada y mayor tamaño

Teniendo en cuenta que la cantidad de núcleos está estrechamente relacionada con la forma y el tamaño de las células; evaluamos la forma que presentaban los parásitos TfMORN3. En condiciones normales de cultivo, *T. foetus* se encuentra como trofozoíto mononucleado ó binucleado, de forma elongada, piriforme y con los flagelos externos (Bondurant y col., 1994; Campero y col., 2006; Rae y col., 2006); así como también en condiciones normales de cultivo pueden observarse algunas células con más de 2 núcleos, que presentan menos acentuado el aspecto piriforme (Iriarte y col., 2023). En este contexto, al analizar la forma de los parásitos TfEpNeo, observamos que la mayoría de los parásitos presentaban la forma elongada, piriforme y con los flagelos externos (**Fig. 15A**). En los parásitos TfMORN3, determinamos un patrón diferente, solamente el 34% de los parásitos eran piriformes, mientras que el 66% restante presentaban una forma redondeada y de mayor tamaño (**Fig. 15B-C**), lo cual concuerda con los resultados obtenidos anteriormente correspondientes a la cantidad de núcleos por parásito.

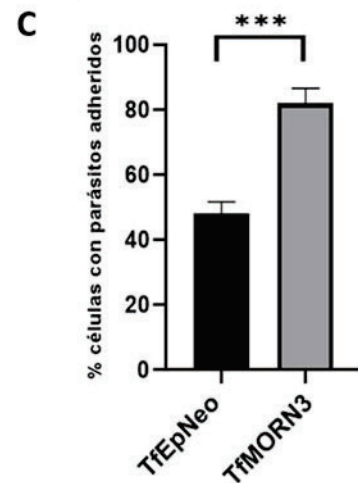
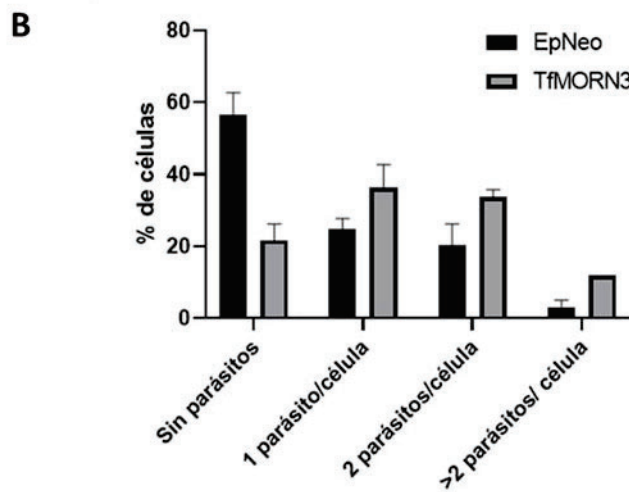
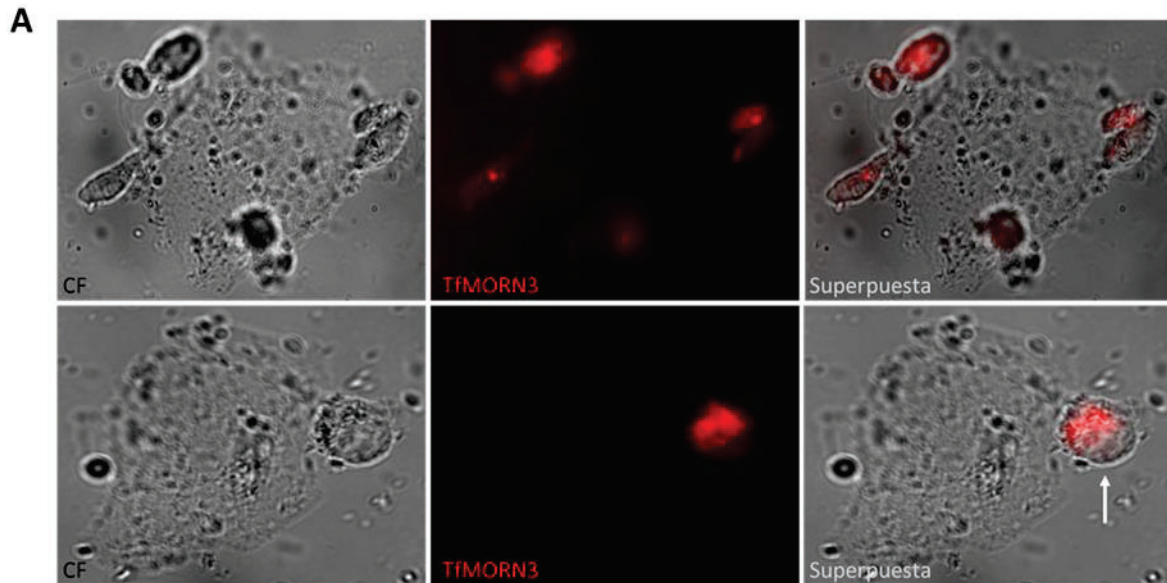


**Figura 15. Análisis de la morfología de los parásitos TfMORN3.** **A.** Imagen representativa de un parásito piriforme. **B.** Imagen representativa de un parásito de forma esferoide. **C.** Gráfico que muestra los porcentajes de parásitos esféricos ó piriformes en parásitos TfEpNeo y TfMORN3.

### Los parásitos TfMORN3 presentan mayor adherencia a la célula hospedadora

Como describimos previamente, existen reportes que postulan un rol relevante de los axostilos en la adherencia a las células hospedadoras en *Trichomonas vaginalis*. En este contexto, y considerando la alteración en la disposición de estas estructuras en los parásitos TfMORN3; evaluamos la capacidad de adherencia de estos parásitos a células hospedadoras de bovino. Incubamos ambas poblaciones de parásitos a células prepuciales de bovino y determinamos la cantidad de parásitos TfMORN3 y TfEpNeo adheridos a cada célula hospedadora (**Fig. 16A**). Los porcentajes de células sin parásitos adheridos en TfEpNeo fue del 56,66% y para TfMORN3 fue de 21,66%; en cuanto a aquellas células que mostraban 1 solo parásito adherido los porcentajes fueron de 24,8% y 36,3% en TfEpNeo y TfMORN3, respectivamente. En aquellas células que mostraron 2 parásitos/célula los porcentajes fueron de 20,33% y 33,6% en TfEpNeo y TfMORN3,

respectivamente. Finalmente, en las células que presentaban más de 2 parásitos por célula los porcentajes fueron del 3% para TfEpNeo y del 12% para TfMORN3 (**Fig. 16B**). Al realizar un análisis integral de los datos obtenidos, pudimos concluir que el 48% de las células prepuciales incubadas con los parásitos TfEpNeo presentaban parásitos adheridos; mientras que un 82% de las células incubadas con parásitos TfMORN3, mostraron parásitos adheridos (**Fig. 16C**). Estos resultados nos estarían sugiriendo TfMORN3 podría estar mediando el proceso de adherencia a la célula hospedadora; lo cual deberá ser analizado en detalle a futuro



**Figura 16: Adherencia de parásitos EpNeo y parásitos TfMORN3 a células epiteliales prepuciales de bovino.** **A.** Imágenes representativas del ensayo de adherencia, donde puede observarse una célula del epitelio prepucial con parásitos TfMORN3 adheridos marcados con Cell tracker red (rojo); en el panel inferior se observa un parásito esferoide (flecha blanca). CF: contraste de fases. **B.** Cuantificación de la adherencia de parásitos TfEpNeo y TfMORN3 a células prepuciales de bovino. Se contaron 100 células prepuciales en total, a las que se agrupó en función de la cantidad de parásitos adheridos en los siguientes grupos: 1) sin parásitos adheridos, 2) con 1 parásito adherido, 3) con 2 parásitos adheridos o con más de 2 parásitos adheridos, para cada población de parásitos. **C.** Gráfico que muestra el porcentaje total de células con parásitos adheridos para parásitos EpNeo y parásitos TfMORN3. La significancia estadística se probó mediante la prueba de Chi-cuadrado (\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

## Discusión

Los motivos MORN varían en número (de 2 a 20), están presentes en proteínas de plantas, animales y protistas; y se pueden encontrar en varias posiciones a lo largo de las secuencias proteicas. Si bien aún no se comprende bien cómo estos motivos MORN afectan las propiedades funcionales de las proteínas, se ha descrito que las secuencias diferenciales en los motivos MORN más que el número, son relevantes para la localización y la función. Las proteínas que contienen estos motivos difieren significativamente en su localización intracelular; y están involucradas en procesos tales como la división, la proliferación celular y en la organización de estructuras membranosas y citoesqueléticas (Zhou y col., 2022).

En el presente trabajo demostramos que la proteína denominada MORN3 de *T. foetus*, presenta una localización citosólica, acorde a lo que sucede en otros tipos celulares. En general, en los parásitos, las proteínas MORN pueden localizarse en las diferentes membranas, mediando el transporte de proteínas y regulando la conexión entre el citoesqueleto y el sistema de endomembranas. Específicamente en el parásito *T. gondii*, la proteína MORN1 se asocia al citoesqueleto y se localiza en estructuras anulares en los extremos apical y posterior del complejo interno de membranas o IMC (formado por vesículas aplanadas y fusionadas que derivan del aparato de Golgi y del retículo endoplasmático que se encuentra por debajo de la membrana plasmática, y es específico de estos organismos); como así también en

el centrocono, que es una estructura nuclear que organiza el huso mitótico, y tienen un rol activo en la división y en la separación de las células hijas (Gubbels y col., 2006; Heaslip y col., 2010)

En *T. foetus*, en ensayos de sobreexpresión de TfMORN3, pudimos observar que los parásitos, en condiciones estándar de cultivo, mostraban tasas de crecimiento más bajas que los parásitos utilizados como control. Luego, al analizar detalladamente el contenido de núcleos por célula; constatamos que la población de TfMORN3 presentaba mayor cantidad de parásitos con 2 ó más núcleos/parásito. En conjunto estos resultados nos estarían indicando un rol de TfMORN3 en la correcta división celular de estos parásitos. En este contexto, en *T. gondii*, la delección del gen que codifica para MORN1 mostró una incorrecta formación del IMC; como así también defectos en la segregación nuclear y en la citocinesis que origina a las dos células hijas. En dicho trabajo, los autores postularon que MORN1 funcionaría como una proteína conectora entre ciertas regiones de la membrana y el citoesqueleto en estos parásitos (Heaslip y col., 2010). En *T. brucei*, TbMORN1 es parte de un complejo multiproteico que se une al cuello de los flagelos; donde TbMORN1 y TbCentrin4 definen una estructura en horquilla que actúa como un componente esencial del citoesqueleto (Morriswood y col., 2009). Además, se reportó que TbMORN1 facilita la entrada de proteínas en la bolsa flagelar y participa en la endocitosis. En *Cryptosporidium parvum* la proteína MORN Cp-P34 es un antígeno de superficie, y candidato interesante como blanco terapéutico (Jaskiewicz y col., 2021). Finalmente, el ciliado *Tetrahymena thermophila* expresa 129 genes codificantes para proteínas MORN; y se demostró que cuando estos motivos se disponen en tándem, actúan como un dominio general de unión a membrana en diferentes proteínas (Habicht y col., 2015).

Por otro lado, es sabido que las proteínas junctofilinas (que contienen motivos MORN) son fundamentales para las uniones estrechas del retículo endoplásmico y la membrana plasmática en las células excitables; y que la pérdida o mutación de estas proteínas conduce a una disfunción neuronal (Takeshima y col., 2000). En *Drosophila*, se ha descrito un rol clave de las proteínas MORN en la regulación de la dinámica de la miosina (Mecklenburg y col., 2015). En mamíferos, las proteínas



MORN están ampliamente distribuidas en diferentes órganos y tejidos. Específicamente, interactúan con fosfolípidos y proteínas, median la conexión entre organelas y membranas; y regulan la homeostasis del sodio y del potasio, y están relacionadas a las enfermedades cardíacas. Las proteínas MORN también regulan la espermatogénesis y la integridad funcional neuronal al participar en el transporte de proteínas y el transporte endosomal. Todos estos antecedentes demuestran la estrecha relación de las proteínas que contienen este tipo de motivos, con el citoesqueleto y las diferentes membranas celulares en diferentes organismos.

En los parásitos TfMORN3, también observamos la presencia de alteraciones en la disposición y el número de los axostilos por parásito al compararlos con los parásitos utilizados como control. En *T. foetus* el sistema pelta-axostilar consiste en dos láminas formadas por microtúbulos que se superponen por delante del núcleo. La pelta sostiene la pared del canal periflagelar, desde el cual emergen los flagelos. La parte anterior del axostilo es más ancha y luego gira sobre sí mismo formando un tubo; el cual parece estrecharse progresivamente hasta su extremo terminal: el cual sobresale de la región celular posterior. En *T. foetus*, el axostilo tiene dos funciones descritas; sirve como orgánulo de soporte y participa en los procesos de división celular, facilitando la constricción de los núcleos durante la cariocinesis (Ribeiro et al. 2000). En estos parásitos, el núcleo se localiza en la región anterior, y el complejo pelta-axostilo, la costa y los flagelos ya están duplicados antes del comienzo de la mitosis (fase S/G2); y la mitosis comienza con la migración de los cuerpos basales y, en consecuencia, los flagelos y el axostilo se mueven juntos. Esto demuestra el rol activo del axostilo en la división celular de estos protozoarios; por lo cual los defectos observados en la proliferación y el aumento de parásitos TfMORN3 multinucleados tendrían una relación con las alteraciones observadas en el posicionamiento de los axostilos.

Por otro lado, en *Saccinobaculus ambloaxostylus* (protozoario que reside en el intestino posterior de la cucaracha *Cryptocercus punctulatus*); se ha descrito al axostilo como un órgano móvil de 30-60 láminas formadas por microtúbulos; y que este organismo puede propagar curvas onduladas a lo largo de su axostilo; así como

también producir un movimiento típico de enrollamiento repetitivo y luego una extensión de todo el axostilo. Presumiblemente, este protozoo posee la capacidad de manipular parámetros reguladores específicos para seleccionar uno u otro tipo de movimiento (Woodrum y col., 1980). En los flagelados *Oxymonas*, *Saccinobaculus* y *Notila* se ha reportado también que los axostilos se contraen y se mueven (Benchimol y col., 2000); y específicamente las ondulaciones de *Saccinobaculus* son el resultado de la motilidad de su axostilo, donde la curvatura de este le facilita el mecanismo de flexión (McIntosh y col., 1973). La falta de coordinación entre el movimiento de los flagelos y las ondas en el axostilo de *Pyrsonympha* llevó a Brugerolle G, (1970) a la conclusión de que el axostilo es activo en la producción de un tipo de ondas. Por otro lado, Mooseker y Tilney (1973), demostraron que el axostilo "se comporta como una unidad autónoma que no depende del resto de la célula para su movimiento".

El citoesqueleto (es decir, axostilo y costa) de *T. foetus* permanece rígido durante el movimiento de natación a diferencia de otras tricomonas y *Giardia*, donde se produce la flexión del soma del parásito; por lo cual la fuerza propulsora principal la ejercen el batido de los flagelos; donde el flagelo recurrente tiene un rol relevante; y recordemos que este flagelo en *T. foetus* es más largo que el de *T. vaginalis* por ejemplo (Lenaghan y col., 2014). Finalmente, se ha reportado que el axostilo en *Trichomonas vaginalis* tiene un rol en la adherencia inicial a la célula hospedadora (Hsu y col., 2023). En *T. foetus* no existen reportes acerca de la relación de esta estructura con la adhesión a la célula hospedadora y se ha descrito que estos parásitos tienden a adherirse a primero a través del flagelo recurrente y posteriormente por el soma celular (Corbeil y col., 1989).

En este contexto, nuestros resultados demuestran que los parásitos que sobreexpresan la TfMORN3, presentan mayor adherencia a las células hospedadoras que los parásitos control; si tenemos en cuenta que dicha población de parásitos posee además los axostilos desordenados, esto nos sugiere que la correcta posición de dichas estructuras sería relevante para este proceso. La mayor diferencia entre el axostilo de *T. vaginalis* y *T. foetus* radica en su longitud: el axostilo

de *T. vaginalis* presenta 8,2  $\mu\text{m}$  de longitud (Cheon y col., 2013) y se extiende considerablemente más allá del extremo posterior del protozoario; mientras que la longitud promedio de esta estructura en *T. foetus* es de 5,4  $\mu\text{m}$  y apenas se extiende más allá del polo posterior. En *Pentatrichomonas hominis* la forma del axostilo se estrecha gradualmente, mientras que en *T. foetus* es uniforme y se estrecha abruptamente formando un extremo fino (Wenrich y col., 1933; Wenrich 1944a, 1944b; Midlej y col., 2011). En *Tritrichomonas mobiliensis* la morfología es muy similar a la *T. foetus*, aunque no se forma el extremo fino al final de la proyección axostilar (Hora y col., 2017). Estas diferencias estructurales de los axostilos podrían estar relacionadas con la funcionalidad de esta estructura en *T. foetus*; por ejemplo, el hecho de que no tenga un rol en la adhesión inicial a la célula hospedadora, como en *T. vaginalis*, podría deberse a que su prolongación que se extiende más allá del polo posterior es más corta en este protozoario. Diferentes estudios demostraron que *T. foetus*, a diferencia de otros tricomonadidos, se unen estrechamente a la célula hospedadora a través de protuberancias similares a filopodios estableciendo una interacción física muy estrecha con la superficie; por lo cual es esperable que las moléculas localizadas tanto en la superficie del parásito como en la superficie de las células huésped participan en el proceso de adherencia de estos protozoarios (Silva Filho y col., 1988; Bonilha y col., 1995). En este contexto, es posible que la proteína TfMORN3 esté estableciendo algún tipo de interacción con los sistemas membranosos (acorde a los descrito para este tipo de proteínas en otros organismos) y que de esta manera pueda tener un rol en el proceso de adherencia; aunque esto deberá ser analizado en detalle en futuros estudios.

## **Conclusión**

La localización citosólica de la proteína MORN3 en *Tritrichomonas foetus* sugiere su participación en procesos celulares fundamentales. Los resultados de nuestra investigación revelan que la sobreexpresión de TfMORN3 altera significativamente el crecimiento normal de los parásitos, lo que se refleja en una disminución en la tasa de crecimiento y la aparición de alteraciones durante la cariocinesis.

Estas alteraciones durante la división celular conducen a una mayor cantidad de núcleos y una mayor cantidad de ADN en los parásitos sobreexpresantes. Además, se observan desórdenes en el citoesqueleto, especialmente en los axostilos, que no se encuentran en proporción 1:1 con la cantidad de núcleos y no albergan correctamente al núcleo y a los cuerpos parabasales.

Estos cambios morfológicos en los parásitos sobreexpresantes, los cuales muestran una forma redondeada y de mayor tamaño en comparación con los parásitos control, sugieren una relación directa entre la sobreexpresión de TfMORN3 y la morfología celular anómala.

Además, nuestros resultados muestran que los parásitos TfMORN3 presentan una mayor adherencia hacia la célula hospedadora, lo que sugiere que TfMORN3 podría estar mediando algún proceso que facilite la adherencia.

En resumen, nuestra investigación proporciona una comprensión más profunda de la función de la proteína MORN3 en *Tritrichomonas foetus* y su impacto en procesos celulares clave como la división celular.

## Bibliografía

Benchimol, M. (2004). Trichomonads under Microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, 10(05), 528–550. doi:10.1017/s1431927604040905

Benchimol, M. (2005). New ultrastructural observations on the skeletal matrix of *Tritrichomonas foetus*. *Parasitology Research*, 97(5), 408–416. doi:10.1007/s00436-005-1480-x

Benchimol M. (2010). The Mastigont System in Trichomonads. *Structures and Organelles in Pathogenic Protists* (pp.1-26). doi: 10.1007/978-3-642-12863-9\_1

Benchimol, M., de Almeida, L. G. P., Vasconcelos, A. T., de Andrade Rosa, I., Reis Bogó, M., Kist, L. W., & de Souza, W. (2017). Draft Genome Sequence of *Tritrichomonas foetus* Strain K. *Genome Announcements*, 5(16). doi:10.1128/genomea.00195-17

Benchimol, M., Diniz, J.A., & Ribeiro, K. (2000). The fine structure of the axostyle and its associations with organelles in Trichomonads. *Tissue Cell*. Apr;32(2):178-87. doi: 10.1054/tice.2000.0102.

BonDurant R.H., Honigberg B.M. (1994). Trichomonads of veterinary importance. In: Kreier JP, editor. *Parasitic protozoa*. New York, NY: Academic; p. 111–88.

BonDurant, R. H. (2005). Venereal Diseases of Cattle: Natural History, Diagnosis, and the Role of Vaccines in their Control. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 21(2), 383–408. doi:10.1016/j.cvfa.2005.03.002

Bonilha, V.L., Ciavaglia Mdo, C., de Souza, W., & Costa e Silva Filho, F. (1995). The involvement of terminal carbohydrates of the mammalian cell surface in the cytoadhesion of trichomonads. *Parasitol Res.*;81(2):121-6. doi: 10.1007/BF00931616. PMID: 7731918.

Brugerolle, G. (1970). Sur l'ultrastructure et la position systématique de *Pyrsonympha vertens* (Zooflagellata Pyrsonymphina) [Ultrastructure and sytemic

place of *Pyrrsonympha vertens* (Zooflagellata Pyrrsonymphina)]. C R Acad Hebd Seances Acad Sci D. 16;270(7):966-9. French. PMID: 4986340.

Campero CM & Cobo ER (2006). *Tritrichomonas foetus*: patogénesis de la mortalidad embrionaria/fetal, caracterización de antígenos vacunales y respuesta inmune inducida. Revista de Medicina Veterinaria, Bs As Argentina vol 87: 47-56

Cela P., Hampl M., Fu K.K., Bosakova M.K., Krejci P., Richman J.M., et al. (2016). MORN5 expression during craniofacial development and its interaction with the BMP and TGFb pathways. Front Physiol.7:378.

Cheon, S.H., Kim, S.R., Song, H.O., Ahn, M.H., & Ryu, J.S. (2013). The dimension of *Trichomonas vaginalis* as measured by scanning electron microscopy. Korean J Parasitol. Apr;51(2):243-6. doi: 10.3347/kjp.2013.51.2.243.

Coceres, V. M., Iriarte, L. S., Miranda-Magalhães, A., Matos, T., Natalia de Miguel, & Pereira-Neves, A. (2021). Ultrastructural and Functional Analysis of a Novel Extra-Axonemal Structure in Parasitic Trichomonads. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.757185>

Collántes-Fernández E., Fort M., Ortega-Mora L. & Schares G. (2018). Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets. *Trichomonas*. Pages 313-388

Corbeil, L.B., Hodgson, J.L., Jones, D.W., Corbeil, R.R., Widders, P.R., & Stephens, L.R. (1989). Adherence of *Tritrichomonas foetus* to bovine vaginal epithelial cells. Infect Immun. Jul;57(7):2158-65. doi: 10.1128/iai.57.7.2158-2165.1989.

Dabrowska, J., Keller, I., Karamon, J., Kochanowski, M., Gottstein, B., Cencek, T., et al. (2020). Whole Genome Sequencing of a Feline Strain of *Tritrichomonas foetus* Reveals Massive Genetic Differences to Bovine and Porcine Isolates. Int. J. Parasitol. 50, 227–233. doi: 10.1016/j.ijpara.2019.12.007

De Bruijn S. & Galloo X. (2021). A special case of hypertrophic cardiomyopathy with a differential diagnosis of isolated cardiac amyloidosis or junctophilin type 2 associated cardiomyopathy. *Acta Clin Belg.* 76(2):136–43.

Delgadillo M.G., L.D., Niazi K. & Johnson P.J. (1997). Transient and selectable transformation of the parasitic protist *Trichomonas vaginalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 4716-4720.

Esson HJ, Morriswood B, Yavuz S, Vidilaseris K, Dong G, Warren G. (2012). Morphology of the trypanosome bilobe, a novel cytoskeletal structure. *Eukaryot Cell.*11(6):761–72.

Frey, C. F., & Müller, N. (2012). *Tritrichomonas* – Systematics of an enigmatic genus. 26(3), 132–136.

Gelbart, S. M., Thomason, J. L., Osypowski, P. J., Kellett, A. V., James, J. A., & Broekhuizen, F. F. (1990). Growth of *Trichomonas vaginalis* in commercial culture media. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(5), 962–964.

Goodger WJ;Skirrow SZ. (1986). Epidemiologic and economic analyses of an unusually long epizootic of trichomoniasis in a large California dairy herd. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 189(7):772-776.

Gookin, J. L., Hanrahan, K., Levy, M. G. (2017). The Conundrum of Feline Trichomonosis. *J. Feline Med. Surg.* 19, 261–274. doi: 10.1177/1098612X17693499

Grimstone A.V., Cleveland L.R. (1965). The Fine Structure and Function of The Contractile Axostyles of Certain Flagellates. *J Cell Biol.*; 24(3):387–400. pmid:14326123

Gubbels MJ, Vaishnava S, Boot N, Dubremetz JF, Striepen B. (2006). A MORN-repeat protein is a dynamic component of the *Toxoplasma gondii* cell division apparatus. *J Cell Sci.* 119(Pt 11):2236–45

Habicht, J., Woehle, C., & Gould, S.B. (2015). *Tetrahymena* Expresses More than a Hundred Proteins with Lipid-binding MORN Motifs that can Differ in their

Subcellular Localisations. *J Eukaryot Microbiol.* Sep-Oct;62(5):694-700. doi: 10.1111/jeu.12216.

Heaslip AT, Dzierszynski F, Stein B, Hu K. (2010). TgMORN1 is a key organizer for the basal complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* 6(2): e1000754.

Hora, A.S., Miyashiro, S.I., Cassiano, F.C., Brandão, P.E., Reche-Junior, A., & Pena, H.F.J. (2017) Report of the first clinical case of intestinal trichomoniasis caused by *Tritrichomonas foetus* in a cat with chronic diarrhoea in Brazil. *BMC Vet Res.* Apr 17;13(1):109. doi: 10.1186/s12917-017-1026-3.

Hsu H.M., Yang Y.Y., Huang Y.H., Chu C.H. & Tu T.J., et al. (2023) Distinct features of the host-parasite interactions between nonadherent and adherent *Trichomonas vaginalis* isolates. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 17(1): e0011016. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011016>

Im Y.J., Davis A.J., Perera I.Y., Johannes E., Allen N.S. & Boss W.F (2007). The N-terminal membrane occupation and recognition nexus domain of Arabidopsis phosphatidylinositol phosphate kinase 1 regulates enzyme activity. *J Biol Chem.*282(8):5443–52.

Iriarte, L., Martínez, C., de Miguel, N., Cóceres, V. (2023) *Tritrichomonas foetus* Cell Division Involves DNA Endoreplication and Multiple Fissions | *Microbiology Spectrum*. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03251-22>

Jaskiewicz, J.J., Tremblay, J.M., Tzipori, S., & Shoemaker, C.B. (2021). Identification and characterization of a new 34 kDa MORN motif-containing sporozoite surface-exposed protein, Cp-P34, unique to *Cryptosporidium*. *Int J Parasitol* ;51(9):761-775. doi: 10.1016/j.ijpara.2021.01.003.

Landstrom A.P., Weisleder N., Batalden K.B., Martijn Bos J., Tester D.J., Ommen S.R., et al. (2007). Mutations in JPH2-encoded junctophilin-2 associated with hypertrophic cardiomyopathy in humans. *J Mol Cell Cardiol.* 42(6):1026–35

Lee J., Han C.T. & Hur Y. (2010). Overexpression of BrMORN, a novel 'membrane occupation and recognition nexus' motif protein gene from Chinese



cabbage, promotes vegetative growth and seed production in Arabidopsis. *Mol Cell*. 29(2):113–22.

Lenaghan, S.C., Nwandu-Vincent, S., Reese, B.E., & Zhang, M. (2014). Unlocking the secrets of multi-flagellated propulsion: drawing insights from *Tritrichomonas foetus*. *J R Soc Interface*. Jan 29;11(93):20131149. doi: 10.1098/rsif.2013.1149.

Li J., Liu H., Raval M.H., Wan J., Yengo C.M., Liu W., et al. (2019). Structure of the MORN4/Myo3a tail complex reveals MORN repeats as protein binding modules. *Structure*.;27(9):1366–74.

Lun, Z.-R., Chen, X.-G., Zhu, X.-Q., Li, X.-R., & Xie, M.-Q. (2005). Are *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas suis* synonyms? *Trends in Parasitology*, 21(3), 122–125. doi:10.1016/j.pt.2004.12.001

Ma H., Xu S.P., Luo D., Xu Z.H. & Xue H.W. (2004). OsPIP5K 1, a rice phosphatidylinositol monophosphate kinase, regulates rice heading by modifying the expression of floral induction genes. *Plant Mol Biol*.54(2):295–310.

Martin-Gomez, S., Gonzalez-Paniello, R., Pereira-Bueno, J., Ortega-Mora, L. M. (1998). Prevalence of *Tritrichomonas Foetus* Infection in Beef Bulls in Northwestern Spain. *Vet. Parasitol*. 75, 265–268. doi: 10.1016/S0304-4017(97)00189-1

Matsushita Y., Furukawa T., Kasanuki H., Nishibatake M., Kurihara Y., Ikeda A., et al. (2007). Mutation of junctophilin type 2 associated with hypertrophic cardiomyopathy. *J Hum Genet*. 52(6):543–8

McIntosh, J.R. (1973). The axostyle of *Saccinobaculus*. II. Motion of the microtubule bundle and a structural comparison of straight and bent axostyles. *J Cell Biol*. Feb;56(2):324-39. doi: 10.1083/jcb.56.2.324. PMID: 4566523; PMCID: PMC2108906.

Mecklenburg, K.L., Freed, S.A., Raval, M., Quintero, O.A., Yengo, C.M., & O'Tousa, J.E. (2015). Invertebrate and vertebrate class III myosins interact with

MORN repeat-containing adaptor proteins. PLoS One. Mar 30;10(3):e0122502. doi: 10.1371/journal.pone.0122502.

Midlej, V., Pereira-Neves, A., Wilges Kist, L., Reis Bogo, M., & Benchimol, M. (2011). Ultrastructural features of *Tritrichomonas mobilensis* and comparison with *Tritrichomonas foetus*, *Veterinary Parasitology*, Volume 182, Issues 2–4, Pages 171-180, ISSN 0304-4017, <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.015>.

Miura A., Kondo H., Yamamoto T., Okumura Y. & Nishio H. (2020) Sudden unexpected death of infantile dilated cardiomyopathy with JPH2 and PKD1 gene variants. *Int Heart J*.61(5):1079–83.

Molina, L., Angón, E., Antón García, J. Caballero-Villalobos, Giorgis, A., Ricardo Horacio Moralejo, & Perea, J. (2018). A retrospective epidemiological analysis of shared risk factors for bovine trichomoniasis and bovine genital campylobacteriosis in La Pampa province (Argentina). 161, 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.10.022>

Molina, L., Perea, J., Guillermo Esteban Meglia, Angón, E., & Antón García. (2013). Spatial and temporal epidemiology of bovine trichomoniasis and bovine genital campylobacteriosis in La Pampa province (Argentina). 110(3-4), 388–394. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.02.019>

Monteiro-Leal, L. H., Farina, M., & de Souza, W. (1996). Free movement of *Tritrichomonas foetus* in a liquid medium: A video-microscopy study. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 34(3), 206–214. doi:10.1002/(sici)1097

Mooseker, M.S., & Tilney, L.G. (1973). Isolation and reactivation of the axostyle. Evidence for a dynein-like ATPase in the axostyle. *J Cell Biol.* Jan;56(1):13-26. doi: 10.1083/jcb.56.1.13.

Morriswood, B., He, C. Y., Sealey-Cardona, M., Yelinek, J., Pypaert, M., & Warren, G. (2009). The bilobe structure of *Trypanosoma brucei* contains a MORN-repeat protein. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 167(2), 95–103. doi:10.1016/j.molbiopara.2009.05

Nakada T, Kashihara T, Komatsu M, Kojima K, Takeshita T, Yamada M. (2018). Physical interaction of junctophilin and the ca(V)1.1 C terminus is crucial for skeletal muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci USA*.115(17):4507–12.

Pereira-Neves, A. & Benchimol, M. (2009) *Tritrichomonas foetus*: Budding from Multinucleated Pseudocysts. *Protist*, Vol. 160, 536-551

Pereira-Neves, A., & Benchimol, M. (2009). *Tritrichomonas foetus*: Budding from Multinucleated Pseudocysts. *Protist*, 160(4), 536–551. <http://doi.org/10.1016/j.protis.2009.05.001>

Pereira-Neves, A., José Luis Rosales-Encina, José Roberto Meyer-Fernandes, & Benchimol, M. (2014). *Tritrichomonas foetus*: Characterisation of ecto-phosphatase activities in the endoflagellar form and their possible participation on the parasite's transformation and cytotoxicity. *Experimental Parasitology*, 142, 67–82. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.04.007>

Pereira-Neves, A., Ribeiro, K. C., & Benchimol, M. (2003). Pseudocysts in Trichomonads – New Insights. *Protist*, 154(3-4), 313–329. doi:10.1078/143446103322454095

Pruzzo C.I. (2023). *Parasitología comparada. Modelos parasitarios. Parte I. Protozoos*. Universidad Nacional de La Plata. Capítulo 21, 247-253. ISBN: 978-950-34-2205-2

Rae, D. O., & Crews, J. E. (2006). *Tritrichomonas foetus*. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 22(3), 595–611. doi:10.1016/j.cvfa.2006.07.001

Ribeiro, K. C., Monteiro-Leal, L. H., & Benchimol, M. (2000). Contributions of the axostyle and flagella to closed mitosis in the protists *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47(5), 481–492.

Sajko S., Grishkovskaya I., Kostan J., Graewert M., Setiawan K., Trubestein L., et al. (2020). Structures of three MORN repeat proteins and a re-evaluation of

the proposed lipid-binding properties of MORN repeats. PLoS ONE.;15(12):e0242677.

Schoch CL, *et al.* (2020) NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford): baaa062. PubMed: 32761142 PMC:PMC7408187.

Shimada H., Koizumi M., Kuroki K., Mochizuki M., Fujimoto H., Ohta H., *et al.* (2004). ARC3, a chloroplast division factor, is a chimera of prokaryotic FtsZ and part of eukaryotic phosphatidylinositol-4-phosphate 5- kinase. Plant Cell Physiol.;45(8):960–7.

Silva Filho, F.C., & de Souza, W. (1988). The interaction of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus* with epithelial cells in vitro. Cell Struct Funct. Aug;13(4):301-10. doi: 10.1247/csf.13.301. PMID: 3180257.

Takeshima H., Komazaki S., Nishi M., Iino M. & Kangawa K. (2000). Junctophilins: a novel family of junctional membrane complex proteins. Mol Cell. 6(1):11–22.

Takeshima, H., Komazaki, S., Nishi, M., Iino, M., & Kangawa, K., (2000) Junctophilins: a novel family of junctional membrane complex proteins. Mol Cell. Jul;6(1):11-22. doi: 10.1016/s1097-2765(00)00003-4.

Vasileva E, Shuvalov O, Petukhov A, Fedorova O, Daks A, Nader R, *et al.* (2020). KMT Set7/9 is a new regulator of Sam68 STAR-protein. Biochem Biophys Res Commun.525(4):1018–24.

Wenrich D.H. & Emmerson M.A. (1933). Studies on the morphology of *Tritrichomonas foetus* Riedmüller (Protozoa, Flagellata) from American cows. J. Morphol. 55:193-205.

Wenrich, D.H. (1944a). Nuclear structure and nuclear division in *Dientamoeba fragilis* (Protozoa). J. Morphol. 74, 467–491.

Wenrich, D.H. (1944b). Studies on *Dientamoeba fragilis* (protozoa). IV. Further observations, with an outline of present-day knowledge of this species. *J. Parasitol.* 30, 322–337.

Woodrum, D.T., & Linck, R.W. (1980). Structural basis of motility in the microtubular axostyle: implications for cytoplasmic microtubule structure and function. *J Cell Biol.* Nov;87(2 Pt 1):404-14. doi: 10.1083/jcb.87.2.404.

Yule, A., S. Skirrow, & R.H. BonDurant. (1989). Bovine Trichomoniasis. 5(12), 373–377. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(89\)90298-6](https://doi.org/10.1016/0169-4758(89)90298-6)

Zhang L., Shang X.J., Li H.F., Shi Y.Q., Li W., Teves M.E., et al. (2015). Characterization of membrane occupation and recognition nexus repeat containing 3, meiosis expressed gene 1 binding partner, in mouse male germ cells. *Asian J Androl.*17(1):86–93.

Zhou, J., Liu, H., Lin, Y., & Zhao, J. (2022). Membrane occupation and recognition nexus (MORN) motif controls protein localization and function. *FEBS Letters*, 596(14), 1839–1850. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14378>.

Última versión de la tesis – 02/05/2024

A handwritten signature in black ink, consisting of a cursive 'a' followed by a long diagonal stroke and a shorter diagonal stroke below it.

Autor de la tesis

A handwritten signature in blue ink, featuring a cursive 'M' followed by a long diagonal stroke.

Director del trabajo