RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste documento será disponibilizado somente a partir de 18/03/2028.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Botucatu

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Estudos funcionais e estruturais da proteína ortóloga a PinX1 e sua influência nos telômeros de *Leishmania* spp.

Stephany Cacete de Paiva

BOTUCATU-SP

2026

STEPHANY CACETE DE PAIVA

Estudos funcionais e estruturais da proteína ortóloga a PinX1 e sua influência nos telômeros de *Leishmania* spp.

.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Genética da Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho', como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas(Genética).

Orientadora: Profª. Drª. Maria Isabel Nogueira Cano

BOTUCATU-SP
2026

C118e

Cacete de Paiva, Stephany

Estudos funcionais e estruturais da proteína ortóloga a PinX1 e sua influência nos telômeros de Leishmania spp. / Stephany Cacete de Paiva. -- Botucatu, 2026

173 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientadora: Maria Isabel Nogueira Cano

1. PinX1. 2. Leishmania. 3. Telomerase. 4. Telômero. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

Estudos funcionais e estruturais da proteína ortóloga a PinX1 e sua influência nos telômeros de *Leishmania* spp.

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu, SP, para obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas (Genética)

Data da defesa: 18/03/2026

Banca Examinadora:

_____

Orientador:
Profa. Dra. Maria Isabel Nogueira Cano
Departamento de Genética, Microbiologia e Imunologia / UNESP / Câmpus de Botucatu – IBB

_____

Membro da Banca:
Profa. Dra. Maria Carolina Quartim Barbosa Elias-Sabbaga
Instituto Butantan, Laboratório Especial de Ciclo Celular

_____

Membro da Banca:
Prof. Dr. Julio Cesar Borges
Departamento de Química e Física Molecular / Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo

_____

Membro da Banca:
Pesquisador Eric Allison philot
Instituto de Ensino e Pesquisa, Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular / Hospital do Câncer de Barretos

_____

Membro da Banca:
Profa. Dra. Luciane Alarcão Dias Melício
Departamento de Patologia / UNESP / Câmpus de Botucatu – FMB

Dedicatória

À memória dos meus pais e do meu avô, cujas lembranças e ensinamentos me acompanharam em cada passo desta jornada.

À minha família presente — meu irmão, meus sobrinhos e minha avó — pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

E a todos que enfrentam a leishmaniose, com a esperança de que a ciência possa contribuir para um futuro melhor.

Agradecimentos

A realização desta tese só foi possível graças ao apoio e à colaboração de muitas pessoas e instituições às quais sou profundamente grata.

Primeiramente, agradeço à FAPESP pelo financiamento e pela bolsa de doutorado (Processo Número: 2021/14798-0), que tornaram este projeto viável e permitiram o desenvolvimento desta pesquisa com dedicação e qualidade. Também agradeço ao Instituto de Biociências de Botucatu (UNESP), por fornecer toda a infraestrutura necessária para que este trabalho pudesse ser conduzido. Ao CIME, CONICET e à Drª. Virgínia Albarracin pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação, meu primeiro intercâmbio, que me ensinou as bases fundamentais para aplicar no meu trabalho.

Sou grata a todos os membros do Departamento de Genética, Microbiologia e Imunologia pela convivência e pequenas interações que tornaram o ambiente de trabalho mais humano e acolhedor.

Um agradecimento especial à minha orientadora, Drª. Maria Isabel Nogueira Cano, por sua paciência, dedicação, orientação constante e por acreditar em mim ao longo de toda a trajetória deste projeto. Sua confiança e seu incentivo foram fundamentais para que eu superasse desafios e aprendesse a cada passo.

Agradeço ao meu coorientador, Dr. Carlos Inácio Ramos, pelo ensinamento dedicado às técnicas de biofísica, que foram fundamentais para o desenvolvimento experimental desta pesquisa.

Sou imensamente grata a todos os colaboradores que contribuíram direta ou indiretamente para meu crescimento acadêmico e científico, Guilherme Henrique Marchi Salvador, Carlos Alexandre H. Fernandes, Marcos Roberto de M. Fontes, Ana Lígia Scott, Carolina Elias Sabagga, Hamine Cristina de Oliveira, Simone Queiroz, Larissa Machado, seja através de discussões, conselhos ou apoio técnico.

Aos alunos de iniciação científica que orientei, agradeço por cada momento compartilhado no laboratório: Leandro, Victor, Leilane, Bruno e Patrick. Ensiná-los foi

uma experiência enriquecedora que me fez aprender ainda mais com cada dúvida, cada descoberta e cada troca que tivemos.

Aos meus colegas de laboratório, Beatriz, Verônica, Arthur, Habytie, Mark, Luis, Débora, Nicole, agradeço pelas oportunidades de aprendizado compartilhadas durante o tempo em que trabalhamos juntos.

Por fim, agradeço à minha família — meus pais, meu irmão, meus sobrinhos, minha avó e todos que estiveram comigo ao longo desta jornada — pelo amor, incentivo e apoio incondicional. Vocês são minha base e minha motivação para seguir adiante, mesmo nos momentos mais desafiadores.

Epígrafe

"O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem."

— João Guimarães Rosa

Resumo para a sociedade

A leishmaniose é uma doença transmitida pela picada de mosquitinhos-palha infectados com o parasito *Leishmania*. No Brasil, milhares de pessoas são afetadas todos os anos, principalmente nas regiões Norte e Nordeste. A doença pode se manifestar como feridas na pele que não cicatrizam ou como uma forma mais grave que afeta órgãos como fígado e baço, podendo levar à morte. Os medicamentos disponíveis atualmente são antigos, tóxicos e causam efeitos colaterais sérios. Além disso, já existem parasitos resistentes aos tratamentos. Por isso, é urgente identificar novos alvos para desenvolver medicamentos mais eficazes e seguros.

O que este estudo investigou?

Nossa pesquisa estudou uma proteína chamada PinX1 presente no parasito causador da leishmaniose. Em seres humanos e em leveduras que fermentam o pão, vinho e cerveja, essa proteína ajuda a controlar o tamanho dos telômeros - que são como as "capinhas" que protegem as pontas dos cromossomos (estruturas que acondicionam nosso DNA), importantes para manter a proliferação celular e evitar o envelhecimento. Parece que a PinX1 também interliga a maquinaria de montagem dos ribossomos, nossas fábricas de proteínas, à de manutenção dos telômeros. Sua ausência ou diminuição provoca defeitos de crescimento celular e alterações no tamanho telomérico, podendo desencadear envelhecimento celular ou eventos tumorais.

Como foi feita a pesquisa?

Nós "desligamos" parcialmente o gene da PinX1 em *Leishmania* usando uma técnica avançada chamada CRISPR (uma espécie de "tesoura genética"). Depois, observamos o que acontecia com os parasitos. Também produzimos a proteína PinX1 em laboratório para estudar sua estrutura e como ela interage com outras proteínas do parasito.

O que descobrimos?

A proteína é essencial para a sobrevivência do parasito: quando tentamos desligar completamente o gene da PinX1, os parasitos morriam, o que mostra que essa proteína é vital para eles.

Afeta a divisão celular: os parasitos com menos PinX1 cresciam mais devagar, acumulavam células que não finalizavam a divisão.

Interfere na montagem de ribossomos: a PinX1 também afeta a montagem dos ribossomos - estruturas que fabricam proteínas dentro da célula.

Interage diretamente com a telomerase e com a proteína TRF: descobrimos que a PinX1 se liga fisicamente à um componente da enzima telomerase e com os telômeros por sua interação com uma proteína telomérica (TRF). A diminuição de quantidade de PinX1 no parasito leva ao encurtamento dos telômeros. Confirmando sua ação na manutenção dessas estruturas.

Estrutura diferente: a proteína PinX1 da *Leishmania* apresenta regiões desorganizadas (como "partes moles") que permitem que ela interaja com várias outras proteínas, o que explica suas funções em diferentes maquinarias.

Por que isso é importante?

Esta pesquisa revelou que a PinX1 da *Leishmania* é um "faz-tudo" essencial para o parasito: ajuda a manter seus cromossomos estáveis, a montar ribossomos e a se dividir corretamente. Por apresentar diferenças estruturais em relação à proteína humana, ela se torna um alvo promissor para o desenvolvimento de novos medicamentos contra o parasito.

Resumo

As leishmanioses são doenças negligenciadas causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, que afetam milhões de pessoas em todo o mundo. A alta toxicidade e resistência aos tratamentos atuais tornam urgente a identificação de novos alvos terapêuticos. Os telômeros, estruturas nucleoproteicas essenciais para a estabilidade genômica, surgem como promissores candidatos. Em eucariotos superiores, a proteína PinX1 é um regulador negativo clássico da telomerase, inibindo sua atividade ao interagir com a subunidade catalítica TERT. No entanto, seu papel em tripanossomatídeos permanecia desconhecido. Nesta tese, realizamos a primeira caracterização funcional e estrutural do ortólogo de PinX1 em *Leishmania* spp. (LmPinX1). Utilizando uma abordagem multifacetada que combinou a superexpressão episssomal da proteína marcada com myc, a obtenção da proteína na forma recombinante, a análise de interatoma, a edição gênica por CRISPR-Cas9 em *L. major*, o sequenciamento de DNA de longa leitura (ONT), a análise da expressão relativa, os ensaios de proliferação e de ciclo celular, além da caracterização biofísica e bioquímica da proteína, demonstramos que a LmPinX1 é essencial e multifuncional. Semelhante a outros eucariotos, a LmPinX1 interage com proteínas envolvidas com maturação de RNA ribossomal e pequenos RNAs nucleolares, além de se associar a proteínas de ciclo celular e com os telômeros via a proteína TRF e o componente TERT da telomerase. A análise funcional demonstrou a impossibilidade de gerar um nocaute em ambos os alelos do gene, sugerindo que LmPinX1 é vital para o parasito. Linhagens heterozigóticas (LmPinX1^{+}/$^{-}$) exibiram fenótipos pleiotrópicos progressivos, incluindo crescimento e divisão celular comprometidos, acúmulo de células na fase S, diminuição da expressão de LSU rRNAS e encurtamento telomérico. O encurtamento progressivo dos telômeros em LmPinX1$^{+/-}$ ao longo das passagens sugere um papel semelhante ao de células tumorais com expressão diminuída de PinX1 e nucleofosmina (proteína envolvida com a biogênese de ribossomos), mas contrasta com leveduras, onde a ausência de PinX1 induz o alongamento dos telômeros. Quanto à diminuição da expressão dos fragmentos rRNA LSU-β e LSU-ε, este fenótipo conecta a LmPinX1 à biogênese de ribossomos, o que foi posteriormente confirmado pela presença de muitos componentes da maquinaria de montagem de ribossomos nos dados de interatoma. Estudos estruturais também revelaram particularidades sobre a LmPinX1. Sua estrutura tridimensional mostra que

ela é intrinsecamente desordenada, apresenta tamanho menor do que seus ortólogos e substituições de resíduos de aminoácidos específicos do gênero. LmPinX1 é capaz de formar monômeros e dímeros, imunoprecipita com a proteína telomérica TRF e interage fisicamente com o domínio N-terminal do componente TERT da telomerase, conforme demonstrado por ensaios de *pull-down*, espectroscopia de fluorescência e *docking* molecular. Coletivamente, nossos resultados revelam que a PinX1 em *Leishmania* pode desempenhar um papel importante na homeostase celular, integrando a manutenção telomérica, o processamento de rRNA e a progressão do ciclo celular. Esta convergência funcional em relação a outros eucariotos destaca a PinX1 como um alvo promissor para o desenvolvimento de novas estratégias quimioterápicas contra as leishmanioses, embora ainda haja muito a ser descoberto sobre esta proteína, especialmente quanto ao seu papel na manutenção dos telômeros.

Palavras-chave: *Leishmania*; PinX1; telômero; telomerase; TERT; TRF; biogênese de ribossomos; proteína intrinsecamente desordenada.

Abstract

Leishmaniasis is a neglected disease caused by parasites of the genus *Leishmania*, affecting millions of people worldwide. The high toxicity and resistance to current treatments make the identification of new therapeutic targets urgent. Telomeres, nucleoprotein structures essential for genomic stability, emerge as promising candidates. In higher eukaryotes, the PinX1 protein is a classic negative regulator of telomerase, inhibiting its activity by interacting with the catalytic subunit TERT. However, its role in trypanosomatids remained unknown. In this thesis, we performed the first functional and structural characterization of the PinX1 ortholog in *Leishmania* spp. (LmPinX1). Using a multifaceted approach that combined episomal overexpression of the myc-tagged protein, recombinant protein production, interactome analysis, CRISPR-Cas9 gene editing in *L. major*, long-reading DNA sequencing (ONT) relative expression analysis, proliferation and cell cycle assays, and biophysical and biochemical characterization of the protein, we demonstrated that LmPinX1 is essential and multifunctional. Similar to other eukaryotes, LmPinX1 interacts with proteins involved in ribosomal RNA maturation and small nucleolar RNAs, in addition to associating with cell cycle proteins and telomeres via the TRF and the telomerase TERT component. Functional analysis demonstrated the impossibility of generating a knockout in both alleles of the gene, suggesting that LmPinX1 is vital for the parasite. Heterozygous lineages (LmPinX1$^{+/-}$) exhibited progressive pleiotropic phenotypes, including impaired cell growth and division, cell accumulation in the S phase, decreased LSU rRNA expression, and telomere shortening. The progressive telomere shortening in LmPinX1$^{+/-}$ across passages suggests a role similar to that of tumor cells with decreased expression of both PinX1 and nucleophosmin (protein involved in ribosome biogenesis), but contrasts with yeast, where the absence of PinX1 induces telomere elongation. Regarding the decreased expression of LSU-β and LSU-ε rRNA fragments, this phenotype connects LmPinX1 to ribosome biogenesis, which was confirmed by the presence of many components of the ribosome assembly machinery in interactome data. Structural studies also revealed particularities about LmPinX1. Its three-dimensional structure shows that it is intrinsically disordered, smaller in size than its orthologs, and exhibits genus-specific amino acid residue substitutions. LmPinX1 is capable of forming monomers and dimers,

immunoprecipitates with the telomeric protein TRF, and physically interacts with the N-terminal domain of the telomerase TERT component, as demonstrated by pull-down assays, fluorescence spectroscopy, and molecular docking. Collectively, our results reveal that PinX1 in *Leishmania* may play an important role in cellular homeostasis, integrating telomeric maintenance, rRNA processing, and cell cycle progression. This functional convergence with respect to other eukaryotes highlights PinX1 as a promising target for the development of new chemotherapeutic strategies against leishmaniasis, although much remains to be discovered about this protein, particularly regarding its role in telomere maintenance.

Keywords: *Leishmania*; PinX1; telomere; telomerase; TERT; TRF; ribosome biogenesis; intrinsically disordered protein.

Índice de ilustrações

1. Introdução

4. Capítulo I

5. Capítulo II

6. Capítulo III

Índice de Tabelas

Lista de abreviaturas

°C - Grau Celsius

µ - micro

µg - Micrograma

µL - Microlitro

µm - Micrômetro

µM - Micromolar

7-AAD - 7-Aminoactinomycin D (corante para DNA)

Å - Angstrom

a.u. - Unidade arbitrária

ANOVA - Analysis of Variance (Análise de Variância)

ATP - Adenosina Trifosfato

Bis-ANS - 4,4'-dianilino-1,1'-binaphthyl-5,5'-disulfonic acid, dipotassium salt

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

BN-PAGE - Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Cas9 - CRISPR-associated protein 9

CD - Circular Dichroism (Dicroísmo Circular)

cDNA - DNA complementar

Co-IP - Co-Immunoprecipitation (Co-Imunoprecipitação)

CRISPR - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

CT - Cycle Threshold (limiar de ciclo)

CTE - C-Terminal Extension (Extensão C-terminal)

DEAD-box - Motivo de aminoácidos (Asp-Glu-Ala-Asp) em helicases

DIG - Digoxigenina

DKC - Diskerina

DLS - Dynamic Light Scattering (Espalhamento Dinâmico de Luz)

DNA - Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

DNase - Desoxirribonuclease

DTT - Ditiotreitol

ECL - Enhanced Chemiluminescence (Quimioluminescência Aprimorada)

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

EdU - 5-Etinil-2'-desoxiuridina

et al. - E colaboradores

FASP - Filter-Aided Sample Preparation (Preparo de Amostra Assistido por Filtro)

FDR - False Discovery Rate (Taxa de Falsas Descobertas)

FISH - Fluorescence In Situ Hybridization (Hibridização Fluorescente in situ)

FITC - Fluorescein Isothiocyanate (Isotiocianato de Fluoresceína)

g - Força gravitacional

GAPDH - Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase)

GAR1 - Gar1 ribonucleoprotein

GO - Gene Ontology

GRAMM - Global RAnge Molecular Matching (software de docking)

GROMACS - GROningen MAchine for Chemical Simulations (software de dinâmica molecular)

H/ACA - Motivo de sequência em snoRNAs

HEPES - Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico

HIFiASM - Haplotype-resolved genome assembly software

HPLC - High-Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

HRP - Horseradish Peroxidase (Peroxidase de Rábano)

HSP - Heat Shock Protein (Proteína de Choque Térmico)

IDP - Intrinsically Disordered Protein (Proteína Intrinsecamente Desordenada)

IGV - Integrative Genomics Viewer

IP - Immunoprecipitation (Imunoprecipitação)

IPTG - Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo)

ITS - Internal Transcribed Spacer (Espaçador Interno Transcrito)

kDa - Kilodalton

L - Litro

La - *Leishmania amazonensis*

LACK - *Leishmania* Homologue of Receptors for Activated C Kinase

LaTERT-NT - Proteína recombinante da parte aminoterminal da TERT de *Leishmania amazonensis*

LCTAS - *Leishmania* Conserved Telomere Associated Sequences

LINCS - LINEAR Constraint Solver (algoritmo de restrição)

Lm - *Leishmania major*

LSU - Large Subunit (Subunidade Maior - ribossomal)

M - Molar

MD - Molecular Dynamics (Dinâmica Molecular)

mg - Miligrama

mL - Mililitro

mM - Milimolar

MMseqs2 - Many-against-Many sequence searching (software de busca de sequências)

mRNA - RNA mensageiro

MS - Mass Spectrometry (Espectrometria de Massas)

MSA - Multiple Sequence Alignment (Alinhamento Múltiplo de Sequências)

MW - Molecular Weight (Peso Molecular)

NCBI - National Center for Biotechnology Information

ng - Nanograma

NHP2 - Nhp2 ribonucleoprotein

Ni-NTA - Níquel-Ácido Nitrilotriacético

nm - Nanômetro

NOP - Proteína Nucleolar

NOP10 - Nop10 ribonucleoprotein

NP-40 - Nonidet P-40 (detergente)

NPM - Nucleofosmina

NPT - Ensemble com número de partículas (N), pressão (P) e temperatura (T) constantes

ns - Nanossegundos

NVT - Ensemble com número de partículas (N), volume (V) e temperatura (T) constantes

OD - Optical Density (Densidade Óptica)

OMS - Organização Mundial da Saúde

ONT - Oxford Nanopore Technology

P - P valor

PAGE - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida)

PARN - Poly(A)-specific Ribonuclease

PBS - Phosphate-Buffered Saline (Tampão Fosfato-Salino)

PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

PDB - Protein Data Bank

pH - Potencial de hidrogênio

plDDT - predicted Local Distance Difference Test (escore de confiança do AlphaFold)

Plk1 - Polo-like kinase 1

PNK - Polynucleotide Kinase (Polinucleotídeo Quinase)

POT1 - Protection Of Telomeres 1

PVDF - Fluoreto de Polivinilideno

RAP1 - Repressor Activator Protein 1

RBP - RNA-Binding Protein (Proteína de Ligação a RNA)

RIPA - Radioimmunoprecipitation Assay Buffer (tampão de lise)

RMSD - Root Mean Square Deviation (Desvio Médio Quadrático)

RNA - Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)

RNase - Ribonuclease

RNP - Ribonucleoprotein (Ribonucleoproteína)

RPA - Replication Protein A (Proteína de Replicação A)

rpm - Rotações por minuto

rRNA - RNA ribossomal

RT - Reverse Transcriptase (Transcriptase Reversa) ou Room Temperature (Temperatura Ambiente)

RT-PCR - Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Reação de Transcriptase Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase)

RT-qPCR - Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR quantitativa em Tempo Real com Transcrição Reversa)

SAM - Sterile Alpha Motif (domínio proteico)

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

SEC-MALS - Size-Exclusion Chromatography coupled with Multi-Angle Light Scattering (Cromatografia de Exclusão de Tamanho acoplada a Espalhamento de Luz Multiângulo)

SEM - Scanning Electron Microscopy (Microscopia Eletrônica de Varredura)

sgRNA - single-guide RNA (RNA guia simples)

SL - Spliced Leader (sequência líder de trans-splicing)

snoRNA - small nucleolar RNA (pequeno RNA nucleolar)

SSU - Small Subunit (Subunidade Menor - ribossomal)

STRING - Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins

TBE - Template Boundary Element

TBM - TRF1-Binding Motif (Motivo de Ligação à TRF1)

TCAB1 - Telomerase Cajal body protein 1

TEN - Telomerase Essential N-terminal domain (Domínio N-terminal Essencial da Telomerase)

TER / TERC - Telomerase RNA Component (Componente de RNA da Telomerase)

TERRA - Telomeric Repeat-containing RNA

TERT - Telomerase Reverse Transcriptase (Transcriptase Reversa da Telomerase)

TID - Telomerase Inhibitory Domain (Domínio Inibitório da Telomerase)

TIN2 - TRF1-Interacting Nuclear Factor 2

TPP1 - Proteína do complexo shelterin (TINT1, PTOP, PIP1)

TRAP - Telomeric Repeat Amplification Protocol (Protocolo de Amplificação de Repetição Telomérica) - também refere-se a um motivo na TERT

TRB - Telomerase RNA Binding

TRBD - Telomerase RNA Binding Domain (Domínio de Ligação ao RNA da Telomerase)

TRF - Terminal Restriction Fragment (Fragmento de Restrição Terminal) ou Telomeric Repeat-binding Factor (Fator de Ligação a Repetições Teloméricas)

TRF1 - Telomeric Repeat Factor 1

TRF2 - Telomeric Repeat Factor 2

TRFH - TRF Homology domain (Domínio de Homologia a TRF)

TSM - Trypanosomatid-Specific Motif (Motivo Específico de Tripanossomatídeos)

U - Unidade

UFABC - Universidade Federal do ABC

UNESP - Universidade Estadual Paulista

UniProt - Universal Protein Resource

UV - Ultravioleta

v - Volume

V - Volt

WHO - World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

α - Alfa

β - Beta

γ - Gama

ε - Épsilon

Ø - Vazio

Sumário

1. Introdução

1.1. Contexto biológico geral

As leishmanioses compreendem um conjunto de doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania* (Neves et al., 2022; Organização Pan-Americana da Saúde, 2021; Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente, 2025). Estas enfermidades representam um importante problema de saúde pública em regiões das Américas, África e Ásia (WHO, 2020, 2021), sendo classificadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como “Doenças tropicais negligenciadas” devido ao seu elevado impacto social e econômico nas populações mais pobres de países tropicais e subtropicais (Figura 1-1) ((OMS), 2025). No Brasil, as leishmanioses permanecem endêmicas, com aproximadamente 13 000 casos de leishmaniose tegumentar registrados em 2023, principalmente nas regiões Norte e Nordeste, e cerca de 2 000 casos anuais de leishmaniose visceral, forma mais grave da doença (Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente, 2025). Esses números evidenciam a persistência da transmissão e a relevância epidemiológica do parasito, reforçando a necessidade de desenvolver novas terapias e estratégias preventivas.

Figura 1-1 Leismaniose: Uma doença tropical negligenciada. Infográfico sobre a leishmaniose, abordando o vetor transmissor, os reservatórios animais, a distribuição geográfica, as formas clínicas, o tratamento e os aspectos epidemiológicos da doença. Elaborado pela autora, com

aprimoramento visual realizado com auxílio de inteligência artificial generativa (Chatgpt) .[1] Adaptado de dados da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS).

Clinicamente, as leishmanioses podem se apresentar desde formas assintomáticas, a lesões cutâneas autolimitantes, como ocorre na leishmaniose cutânea, ou lesões desfigurantes em regiões mucosas e mucocutâneas; ou ainda, com envolvimento de baço e fígado, podendo levar a óbito, como ocorre na leishmaniose visceral (Neves et al., 2022). A apresentação da doença depende do estado imunológico do hospedeiro e da espécie do parasito. No Brasil, *Leishmania* amazonensis e *L. braziliensis* estão associadas às formas cutânea e mucosa da doença, enquanto *L. infantum* é responsável pela forma visceral (Organização Pan-Americana da Saúde, 2021; Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente, 2025).

O gênero *Leishmania* pertence à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae. Os parasitos apresentam dimorfismo morfológico ao longo de seu ciclo de vida, alternando entre as formas promastigota e amastigota (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**), as quais são adaptadas aos ambientes do inseto vetor e do hospedeiro vertebrado, respectivamente (Bates, 2007; Conceição-Silva; Alves, 2014). A forma promastigota, encontrada no trato digestório do flebotomíneo e mantida em cultura *in vitro*, apresenta morfologia alongada e fusiforme, com comprimento médio variando entre 10 e 20 µm, possuindo um único flagelo emergente da bolsa flagelar, responsável pela motilidade celular (Neves et al., 2022; Real; Mortara, 2012; Wheeler; Gluenz; Gull, 2011a). O núcleo localiza-se aproximadamente na região central da célula, enquanto o cinetoplasto — uma estrutura especializada rica em DNA mitocondrial — encontra-se próximo à extremidade anterior, adjacente à base do flagelo (Neves et al., 2022; Real; Mortara, 2012). Em contraste, a forma amastigota, presente no interior de vacúolos parasitóforos de macrófagos do hospedeiro vertebrado, é arredondada ou oval, medindo cerca de 2 a 5 µm de diâmetro, e não apresenta flagelo externo, embora mantenha a estrutura flagelar curta e interna (Real; Mortara, 2012; Wheeler; Gluenz; Gull, 2011a). Apesar das diferenças morfológicas marcantes entre as duas formas evolutivas, ambas compartilham características celulares típicas dos tripanossomatídeos, como a presença de uma única mitocôndria ramificada, um citoesqueleto organizado por microtúbulos subpeliculares e uma

organização nuclear altamente conservada (Real; Mortara, 2012; Wheeler; Gluenz; Gull, 2011a).

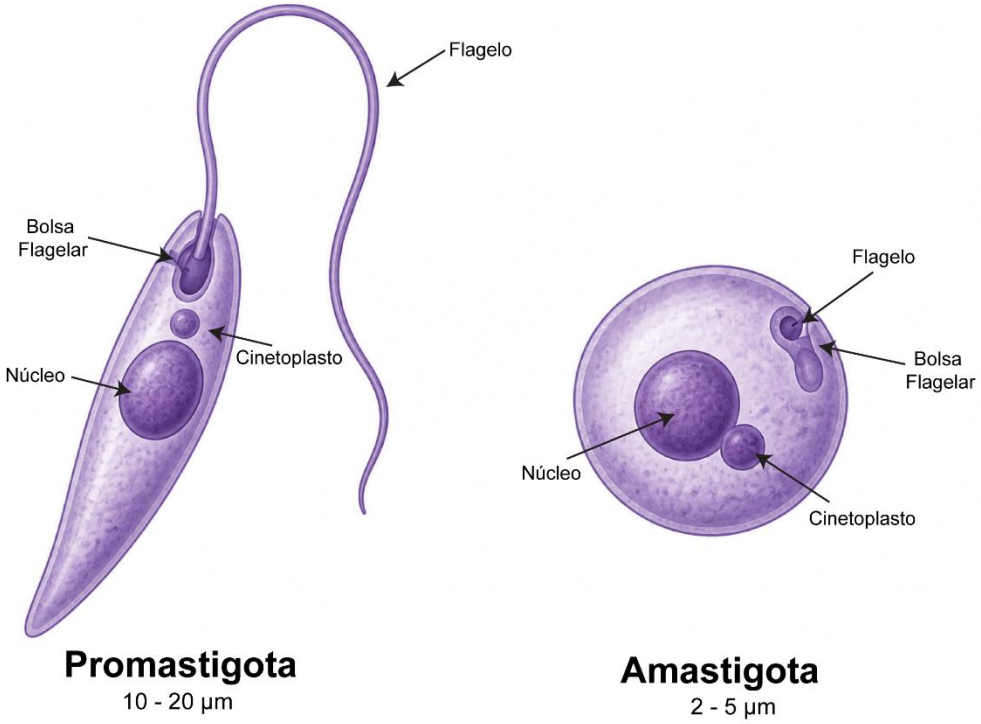

Figura 1-2 Representação esquemática das formas evolutivas de *Leishmania*: promastigota (à esquerda), forma flagelada presente no inseto vetor, e amastigota (à direita), forma arredondada intracelular encontrada em células do hospedeiro vertebrado. Estão indicadas estruturas celulares simplificadas, incluindo núcleo, cinetoplasto, bolsa flagelar e flagelo. Figura elaborada pela autora, com auxílio de inteligência artificial generativa para refinamento visual com base em Neves et al., 2022.

O ciclo de infecção inicia-se quando mosquitos flebotomíneos fêmeas do gênero Lutzomyia ingerem formas amastigotas durante o repasto sanguíneo. No intestino do vetor, o parasito se diferencia e se multiplica em promastigotas procíclicas, leptomonadas, retroleptomonadas e promastigotas metacíclicas, esta última forma altamente infectiva. Ao ser inoculada em um hospedeiro vertebrado, a forma metacíclica é fagocitada por neutrófilos e macrófagos, transformando-se novamente em amastigotas no vacúolo parasitóforo. A multiplicação intracelular permite a disseminação da infecção e o surgimento das manifestações clínicas (Neves et al., 2022; Organização Pan-Americana da Saúde, 2021; Serafim et al., 2018) (Figura 1-3).

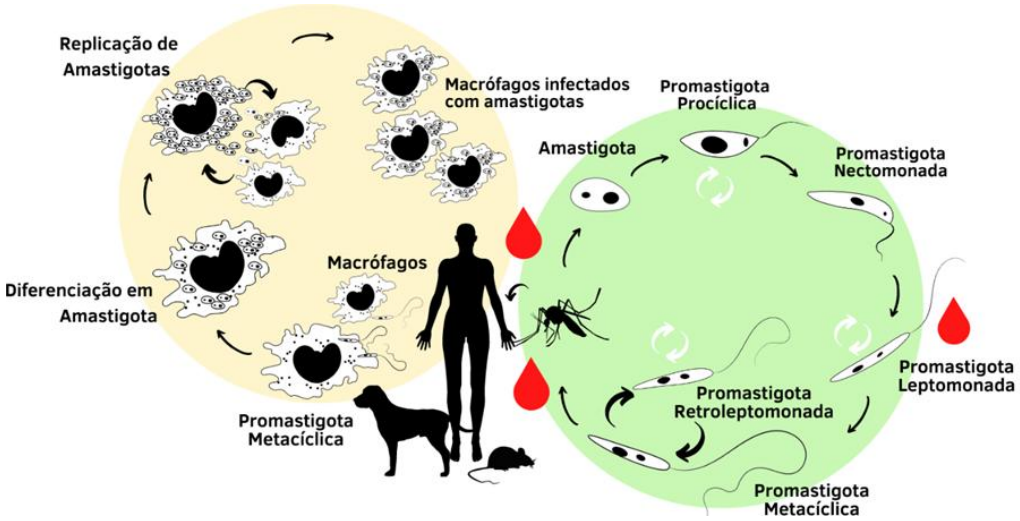

Figura 1-3 Ciclo de desenvolvimento de *Leishmania* sp. O mosquito vetor ingere formas amastigotas durante o repasto sanguíneo de um hospedeiro infectado. No intestino do inseto, o parasito se diferencia em promastigotas procíclicas e leptomonadas, que podem se desdiferenciar em retroleptomonadas após novo repasto. Essas formas se transformam em promastigotas metacíclicas, não replicativas, mas altamente infectivas, que são transmitidas ao hospedeiro vertebrado em um novo repasto sanguíneo. Figura adaptada de Serafim et al., (2018).

Embora existam tratamentos como os antimoniais pentavalentes e a anfotericina B, estes apresentam alta toxicidade e custo elevado, e a resistência dos parasitos a esses fármacos tem aumentado. Além disso, não há vacina disponível, de modo que a prevenção depende do controle do vetor e de melhorias sanitárias e habitacionais (Bethony et al., 2011; Mukherjee et al., 2013; Ponte-Sucre et al., 2017; Taslimi; Zahedifard; Rafati, 2018). Esse cenário reforça a necessidade de identificar novos alvos moleculares para o desenvolvimento de terapias mais eficazes, bem como de ampliar o conhecimento básico sobre a biologia do parasita.

Compreender a biologia celular de *Leishmania* spp., incluindo morfologia, ciclo de vida e dinâmica celular, é fundamental para investigar proteínas nucleares e processos essenciais como a manutenção telomérica. Estes conhecimentos fornecem o contexto necessário para estudar proteínas reguladoras da telomerase, como a PinX1, e seu papel multifuncional no parasito.

9. Bibliografia

ABRAHAM, Mark James *et al.* Gromacs: High-performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19–25, 2015.

ALEXANDRE, Carlos *et al.* **Espectroscopia de Dicroísmo Circular e Análise de Proteínas**. *[S.l.: S.n.]*.

ALONGE, Michael *et al.* RaGOO: fast and accurate reference-guided scaffolding of draft genomes. **Genome Biology**, v. 20, n. 1, p. 224, 28 dez. 2019.

ALONGE, Michael *et al.* Automated assembly scaffolding using RagTag elevates a new tomato system for high-throughput genome editing. **Genome Biology**, v. 23, n. 1, p. 258, 15 dez. 2022.

ALTSCHUL, Stephen F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1 set. 1997.

AMODEO, Simona *et al.* A trypanosome-specific complex mediates late-stage processing of cytosolic LSU rRNA. **Nucleic Acids Research**, v. 53, n. 22, 26 nov. 2025.

ARAVIND, L.; KOONIN, Eugene V. G-patch: a new conserved domain in eukaryotic RNA-processing proteins and type D retroviral polyproteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 24, n. 9, p. 342–344, set. 1999.

ASSIS, Luiz H. C. *et al.* Cell cycle, telomeres, and telomerase in *Leishmania* spp.: What do we know so far? **Cells MDPI**, 1 nov. 2021.

AUTEXIER, Chantal; LUE, Neal F. The Structure and Function of Telomerase Reverse Transcriptase. **Annual Review of Biochemistry**, v. 75, n. 1, p. 493–517, 1 jun. 2006.

BANIK, Soma S. R. *et al.* C-Terminal Regions of the Human Telomerase Catalytic Subunit Essential for In Vivo Enzyme Activity. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 17, p. 6234–6246, set. 2002.

BANIK, Soma S. R.; COUNTER, Christopher M. Characterization of interactions between PinX1 and human telomerase subunits hTERT and hTR. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 50, p. 51745–51748, 2004.

BARBÉ-TUANA, Florencia *et al.* Human Chromosome Telomeres. **Human Genome Structure, Function and Clinical Considerations**, p. 207–243, 2021.

BATES, Paul A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, ago. 2007.

BENEKE, Tom *et al.* A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids Subject Category: Subject Areas: 2017.

BERMAN, Helen M. *et al.* The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 1 jan. 2000.

BETHONY, Jeffrey M. *et al.* Vaccines to combat the neglected tropical diseases. **Immunological Reviews**, v. 239, n. 1, p. 237–270, 2011.

BLACK, Jennifer A. *et al.* Life in plastic, it's fantastic! How *Leishmania* exploits genome instability to shape gene expression. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, 26 jan. 2023.

BLACKBURN, Elizabeth H. Switching and Signaling at the Telomere. **Cell**, v. 106, n. 6, p. 661–673, set. 2001.

BOTHRA, Asim *et al.* A fluorescence spectroscopic and molecular dynamics study of bis-ans/protein interaction. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 15, n. 5, p. 959–966, 1998.

BROWN, Martha P.; ROYER, Catherine. Fluorescence spectroscopy as a tool to investigate protein interactions. Abbreviations: DHF, 4-diethylamino-3-hydroxyflavone; DPH, 1,6-diphenyl-1,3 hexatriene; FRET, fluorescence resonance energy transfer; SFCS, scanning fluctuation correlation spectroscopy; TMRh, tetramethylrhodamine; TR, tryptophan repressor protein**. Current Opinion in Biotechnology**. *[S.l.: S.n.]*.

BURGESS, Richard R. Chapter 17 Refolding Solubilized Inclusion Body Proteins. 1. ed. *[S.l.]*: Elsevier Inc., 2009. v. 463

BUSTIN, Stephen A. *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 1 abr. 2009.

CANO, M. I. N. *et al.* Telomerase in kinetoplastid parasitic protozoa**.** **Biochemistry**. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <www.pnas.org.>.

CHAN, Simon R. W. L.; BLACKBURN, Elizabeth H. Telomeres and telomerase. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 359, n. 1441, p. 109–21, 29 jan. 2004.

CHEN, Yan Ling *et al.* The telomerase inhibitor Gno1p/PINX1 activates the helicase Prp43p during ribosome biogenesis. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 11, p. 7330–7345, 17 jun. 2014.

CHEN, Yong *et al.* A shared docking motif in TRF1 and TRF2 used for differential recruitment of telomeric proteins. **Science**, v. 319, n. 5866, p. 1092–1096, 22 fev. 2008.

CHENG, Haoyu *et al.* Haplotype-resolved de novo assembly using phased assembly graphs with hifiasm. **Nature Methods**, v. 18, n. 2, p. 170–175, 1 fev. 2021.

CHENG, Haoyu *et al.* Haplotype-resolved assembly of diploid genomes without parental data. **Nature Biotechnology**, v. 40, n. 9, p. 1332–1335, 24 set. 2022.

CHENG, Haoyu *et al.* Scalable telomere-to-telomere assembly for diploid and polyploid genomes with double graph. **Nature Methods**, v. 21, n. 6, p. 967–970, 10 jun. 2024.

CHOUDHURY, Kohelia *et al.* Trypanosomatid RACK1 Orthologs Show Functional Differences Associated with Translation Despite Similar Roles in *Leishmania* Pathogenesis. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. e20710, 3 jun. 2011.

CLAYTON, Christine. Regulation of gene expression in trypanosomatids: Living with polycistronic transcription. **Open Biology**, v. 9, n. 6, 1 jun. 2019.

CONCEIÇÃO-SILVA, Fátima; ALVES, Carlos Roberto. **Leishmanioses do continente americano**. *[S.l.]*: Editora FIOCRUZ, 2014.

CONSORTIUM, The UniProt *et al.* UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. **Nucleic Acids Research**, v. 1, n. 1256879, p. 13–14, 2013.

CONTE, F. F.; CANO, M. I. N. Genomic organization of telomeric and subtelomeric sequences of *Leishmania* (*Leishmania*) amazonensis. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 13, p. 1435–1443, 1 nov. 2005.

DA SILVA, Marcelo S. *et al.* The *Leishmania* amazonensis TRF (TTAGGG repeat-binding factor) homologue binds and co-localizes with telomeres. **BMC Microbiology**, v. 10, 2010.

DA SILVA, Vitor Luiz *et al.* Biochemical and structural characterization of the RT domain of *Leishmania* sp. telomerase reverse transcriptase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1867, n. 11, p. 130451, nov. 2023.

DAMASCENO, Jeziel D. *et al.* Evidence for regulated expression of Telomeric Repeat-containing RNAs (TERRA) in parasitic trypanosomatids. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 112, n. 8, p. 572–576, 2017.

DE LANGE, Titia. *Shelterin*: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. **Genes & Development**, v. 19, n. 18, p. 2100–2110, 15 set. 2005.

DE OLIVEIRA, Beatriz Cristina Dias *et al. Leishmania major* telomerase RNA knockout: From altered cell proliferation to decreased parasite infectivity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 279, p. 135150, nov. 2024.

DECUYPERE, S. *et al.* Differential polyadenylation of ribosomal RNA during post-transcriptional processing in. **Parasitology**, v. 131, n. 3, p. 321–329, 10 set. 2005.

DEY, Abhishek *et al.* In vivo architecture of the telomerase RNA catalytic core in Trypanosoma brucei. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. 21, p. 12445–12466, 2 dez. 2021.

DEY, Abhishek; CHAKRABARTI, Kausik. Current Perspectives of Telomerase Structure and Function in Eukaryotes with Emerging Views on Telomerase in Human Parasites. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, 24 jan. 2018.

DIESH, Colin *et al.* JBrowse 2: a modular genome browser with views of synteny and structural variation. **Genome Biology**, v. 24, n. 1, p. 74, 17 abr. 2023.

DONALD, Jason E.; KULP, Daniel W.; DEGRADO, William F. Salt bridges: Geometrically specific, designable interactions. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 79, n. 3, p. 898–915, 5 mar. 2011.

DUMETZ, F. *et al.* Molecular Preadaptation to Antimony Resistance in *Leishmania donovani* on the Indian Subcontinent. **mSphere**, v. 3, n. 2, 25 abr. 2018.

ERDE, Jonathan; LOO, Rachel R. Ogorzalek; LOO, Joseph A. Enhanced FASP (eFASP) to Increase Proteome Coverage and Sample Recovery for Quantitative Proteomic Experiments. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 4, p. 1885–1895, 4 abr. 2014.

FAVICCHIO, Rosy *et al.* Fluorescence Spectroscopy and Anisotropy in the Analysis of DNA-Protein Interactions. *In*: **Methods Mol Biol..** *[S.l.: S.n.]*. p. 589–611.

FERNANDES, Carlos A. H. *et al.* Dual cellular localization of the *Leishmania amazonensis* Rbp38 (LaRbp38) explains its affinity for telomeric and mitochondrial DNA. 2019.

FERNANDES, Carlos A. H. *et al.* A multi-approach analysis highlights the relevance of RPA-1 as a telomere end-binding protein (TEBP) in *Leishmania amazonensis*. 2020.

FERNÁNDEZ-MOYA, Sandra M.; ESTÉVEZ, Antonio M. Posttranscriptional control and the role of RNA-binding proteins in gene regulation in trypanosomatid protozoan parasites. **WIREs RNA**, v. 1, n. 1, p. 34–46, 6 jul. 2010.

FISCHER, G.; AUMÜLLER, T. Regulation of peptide bond cis/trans isomerization by enzyme catalysis and its implication in physiological processes. *In*: **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2003. p. 105–150.

FORINO, Nicholas M.; HENTSCHEL, Jendrik; STONE, Michael D. Cryo-EM structures tell a tale of two telomerases. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 28, n. 6, p. 457–459, 28 jun. 2021.

GHANIM, George E. *et al.* Structure of human telomerase holoenzyme with bound telomeric DNA. **Nature**, v. 593, p. 449, 2021.

GIARDINI, M. A. *et al. Leishmania amazonensis*: Partial purification and study of the biochemical properties of the telomerase reverse transcriptase activity from promastigote-stage. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 243–248, jan. 2011.

GIARDINI, Miriam A. *et al.* The putative telomerase reverse transcriptase component of *Leishmania amazonensis*: gene cloning and characterization. **Parasitology Research**, v. 98, n. 5, p. 447–454, 14 abr. 2006.

GIARDINI, Miriam Aparecida *et al.* Telomere and Telomerase Biology. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 125, p. 1–40, 1 jan. 2014.

GRANDIN, Nathalie; CHARBONNEAU, Michel. Protection against chromosome degradation at the telomeres. **Biochimie**, v. 90, n. 1, p. 41–59, jan. 2008.

GUGLIELMI, Benjamin; WERNER, Michel. The yeast homolog of human PinX1 is involved in rRNA and small nucleolar RNA maturation, not in telomere elongation inhibition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 38, p. 35712–35719, 20 set. 2002.

HERNÁNDEZ, Roberto; CEVALLOS, Ana María. Ribosomal RNA gene transcription in trypanosomes. **Parasitology Research**, v. 113, n. 7, p. 2415–2424, 15 jul. 2014.

HO, Sai-Tim *et al.* The PinX1/NPM interaction associates with hTERT in early-S phase and facilitates telomerase activation. **Cell & Bioscience**, v. 9, n. 1, p. 47, 13 dez. 2019.

HOMBACH, Antje *et al.* A small heat shock protein is essential for thermotolerance and intracellular survival of *Leishmania donovani*. **Journal of Cell Science**, 1 jan. 2014.

JIANG, Lin; LAI, Luhua. CH···O Hydrogen Bonds at Protein-Protein Interfaces. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 40, p. 37732–37740, out. 2002.

JO, Sunhwan *et al.* CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. **Journal of Computational Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 1859–1865, 10 ago. 2008.

JUMPER, John *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583–589, 26 ago. 2021.

KAPLER, Geoffrey M.; COBURN, Cara M.; BEVERLEY, Stephen M. Stable Transfection of the Human Parasite *Leishmania major* Delineates a 30-Kilobase Region Sufficient for Extrachromosomal Replication and Expression. **MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY**. *[S.l.: S.n.]*.

KATCHALSKI-KATZIR, E. *et al.* Molecular surface recognition: determination of geometric fit between proteins and their ligands by correlation techniques. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 6, p. 2195–2199, 15 mar. 1992.

KELLY, Sharon M.; JESS, Thomas J.; PRICE, Nicholas C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, 10 ago. 2005.

KEO, Ponnarath *et al.* Increased Stability of Nucleolar PinX1 in the Presence of TERT. **Molecules and Cells**, v. 38, n. 9, p. 814–820, 30 set. 2015.

KUMAR, Sandeep; NUSSINOV, Ruth. Close-range electrostatic interactions in proteins. **Chembiochem: a European journal of chemical biology**, v. 3, n. 7, p. 604–17, 2 jul. 2002.

LAMBERT-LANTEIGNE, Patrick; YOUNG, Adrian; AUTEXIER, Chantal. Complex interaction network revealed by mutation of human telomerase ‘Insertion in Fingers’ and essential N-terminal domains, and the telomere protein TPP1. **Journal of Biological Chemistry**, p. 102916, jan. 2023.

LEWIS, Karen A.; WUTTKE, Deborah S. **Telomerase and telomere-associated proteins: Structural insights into mechanism and evolution**. **Structure**, 11 jan. 2012.

LI, Hai-Long *et al.* PinX1: structure, regulation and its functions in cancer. **Ongetcontar**, v. 7, 2016.

LI, Heng *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics**, v. 25, n. 16, p. 2078–2079, 15 ago. 2009.

LI, Heng. New strategies to improve minimap2 alignment accuracy. **Bioinformatics**, v. 37, n. 23, p. 4572–4574, 7 dez. 2021.

LIN, Jue *et al.* Protein catalytic subunit in an inactive complex lacking telomerase Nucleolar protein PinX1p regulates telomerase by sequestering its protein catalytic subunit in an inactive complex lacking telomerase RNA. 2004.

LIN, Jue; BLACKBURN, Elizabeth H. Nucleolar protein PinX1p regilates telomerase by sequestering its protein catalytic subunit in an inactive complex lacking telomerase RNA. **Genes & development**, v. 18, 2004.

LOUCHE, Arthur; SALCEDO, Suzana P.; BIGOT, Sarah. Protein–Protein Interactions: Pull-Down Assays. *In*: *[S.l.: S.n.]*. p. 247–255.

LU, Gang *et al.* Acetylation of microtubule-binding PinX1 orchestrates ribosome biogenesis to nutrient starvation via the RNA polymerase I preinitiation complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 301, n. 8, p. 110465, ago. 2025.

LYČKA, Martin *et al.* WALTER: an easy way to online evaluate telomere lengths from terminal restriction fragment analysis. **BMC Bioinformatics**, v. 22, n. 1, p. 145, 22 dez. 2021.

MADIGAN, Michael T. *et al.* **Brock Biology of Microorganisms**. 15. ed. *[S.l.]*: Pearson, 2018.

MATHIEU, N. *et al.* **Telomeres and chromosomal instability**. **Cellular and Molecular Life Sciences**, mar. 2004.

MICSONAI, András *et al.* Disordered–Ordered Protein Binary Classification by Circular Dichroism Spectroscopy. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 9, p. 373, 3 maio 2022a.

MICSONAI, András *et al.* BeStSel: webserver for secondary structure and fold prediction for protein CD spectroscopy. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. W1, p. W90–W98, 5 jul. 2022b.

MILES, Andrew J.; RAMALLI, Sergio G.; WALLACE, B. A. DichroWeb, a website for calculating protein secondary structure from circular dichroism spectroscopic data. **Protein Science**, v. 31, n. 1, p. 37–46, 21 jan. 2022.

MITREVA, Makedonka *et al.* The draft genome of the parasitic nematode Trichinella spiralis. **Nature Genetics**, v. 43, n. 3, p. 228–235, 20 mar. 2011.

MOREA, Edna G. O. *et al.* A calmodulin-like protein (LCALA) is a new *Leishmania amazonensis* candidate for telomere end-binding protein. 2017.

MOREA, Edna Gicela Ortiz *et al.* Exploring TERRA during *Leishmania major* developmental cycle and continuous in vitro passages. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 174, p. 573–586, 2021.

MOUFFOK, Saïda *et al.* The G-patch activators Pfa1 and PINX1 exhibit different modes of interaction with the Prp43 RNA helicase. **RNA Biology**, v. 18, n. 4, p. 510–522, 2021.

MUKHERJEE, Angana *et al.* Telomeric gene deletion and intrachromosomal amplification in antimony-resistant *Leishmania*. **Molecular Microbiology**, v. 88, n. 1, p. 189–202, abr. 2013.

NETO, J. L. Siqueira *et al. Leishmania* replication protein A-1 binds in vivo single-stranded telomeric DNA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 358, n. 2, p. 417–423, 29 jun. 2007.

NEVES, David Pereira *et al.* **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu, 2022.

NIGRO, P.; POMPILIO, G.; CAPOGROSSI, M. C. Cyclophilin A: a key player for human disease. **Cell Death & Disease**, v. 4, n. 10, p. e888–e888, 31 out. 2013.

OH, Bong Kyeong *et al.* Rat homolog of PinX1 is a nucleolar protein involved in the regulation of telomere length. **Gene**, v. 400, n. 1–2, p. 35–43, 2007.

(OMS), Organização Mundial da Saúde. **Neglected Tropical Diseases: Questions & Answers**. Geneva: World Health Organization, 2025. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/neglected-tropical-diseases>.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Atlas interativo de leishmaniose nas Américas: aspectos clínicos e diagnósticos diferenciais**. Washington, D.C: Pan American Health Organization, 2021.

PAGÈS, Hervé *et al.* **Biostrings: Efficient manipulation of biological strings**., 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.18129/B9.BIOC.BIOSTRINGS>

PAIN, Roger H. Determining the Fluorescence Spectrum of a Protein. **Current Protocols in Protein Science**, v. 38, n. 1, nov. 2004.

PAIVA, Stephany C. *et al.* Exploring the structure and nucleic acid interactions of the *Leishmania* sp. telomerase reverse transcriptase N-terminal region. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 764, p. 110289, fev. 2025.

PALM, Wilhelm; DE LANGE, Titia. How Shelterin Protects Mammalian Telomeres. **Annual Review of Genetics**, v. 42, n. 1, p. 301–334, 1 dez. 2008.

PAVANI, R. S. *et al.* RPA-1 from *Leishmania amazonensis* (LaRPA-1) structurally differs from other eukaryote RPA-1 and interacts with telomeric DNA via its N-terminal OB-fold domain. **FEBS Letters**, v. 588, n. 24, p. 4740–4748, 20 dez. 2014.

PEARSON, William R. BLAST and FASTA similarity searching for multiple sequence alignment. **Methods in Molecular Biology**, v. 1079, p. 75–101, 2014.

PEDERSON, T. The Nucleolus. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 3, p. a000638–a000638, 1 mar. 2011.

PELLERIN, David *et al.* Amicon-adapted enhanced FASP: an in-solution digestion-based alternative sample preparation method to FASP. **F1000Research**, v. 4, p. 140, 24 set. 2015.

PERCZEL, A. *et al.* The evaluation of type I and type II β-turn mixtures: Circular dichroism, NMR and molecular dynamics studies. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 41, n. 3, p. 223–236, 1993.

PERONI, Luis A. LaTBP1: A *Leishmania amazonensis* DNA-binding protein that associates in vivo with telomeres and GT-rich DNA using a Myb-like domain. v. 465, p. 399–409, 2007.

PETTERSEN, Eric F. *et al.* UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. **Protein Science**, v. 30, n. 1, p. 70–82, 22 jan. 2021.

PONTE-SUCRE, Alicia *et al.* Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases**Public Library of Science,, 14 dez. 2017.

PRINTZ, Miriam; FRIESS, Wolfgang. Simultaneous detection and analysis of protein aggregation and protein unfolding by size exclusion chromatography with post column addition of the fluorescent dye BisANS. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 2, p. 826–837, 2012.

RAJAN, K. Shanmugha *et al.* Structural and mechanistic insights into the function of *Leishmania* ribosome lacking a single pseudouridine modification. **Cell Reports**, v. 43, n. 5, p. 114203, maio 2024.

RAMÍREZ, Fidel *et al.* deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W160–W165, 8 jul. 2016.

RAMÓN, Ana *et al.* Inclusion bodies: not that bad…. **Frontiers in Microbiology**, v. 5 56, 2014.

REAL, Fernando; MORTARA, Renato A. The Diverse and Dynamic Nature of *Leishmania* Parasitophorous Vacuoles Studied by Multidimensional Imaging. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, p. e1518, 14 fev. 2012.

ROBERT, Xavier; GUILLON, Christophe; GOUET, Patrice. FoldScript: a web server for the efficient analysis of AI-generated 3D protein models. **Nucleic Acids Research**, v. 53, n. W1, p. W277–W282, 7 jul. 2025.

ROBERT-PAGANIN, Julien; RÉTY, Stéphane; LEULLIOT, Nicolas. Regulation of DEAH/RHA helicases by G-patch proteins. **BioMed Research International** Hindawi Limited,, 2015.

ROBINSON, James T. *et al.* Integrative genomics viewer. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 24–26, 1 jan. 2011.

ROBINSON, James T. *et al.* Variant Review with the Integrative Genomics Viewer. **Cancer Research**, v. 77, n. 21, p. e31–e34, 1 nov. 2017.

ROBINSON, James T. *et al.* igv.js: an embeddable JavaScript implementation of the Integrative Genomics Viewer (IGV). **Bioinformatics**, v. 39, n. 1, 1 jan. 2023.

RODRÍGUEZ-CARMONA, Escarlata *et al.* Isolation of cell-free bacterial inclusion bodies. p. 1–9, 2010.

ROGERS, Matthew B. *et al.* Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. **Genome Research**, v. 21, n. 12, p. 2129–2142, dez. 2011.

ROY, Siddhartha; BHATTACHARYYA, B. Fluorescence Spectroscopic Studies of Proteins. *In*: *[S.l.: S.n.]*. p. 101–114.

ROYER, Catherine A. **Probing protein folding and conformational transitions with fluorescence**. **Chemical Reviews**, maio 2006.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, jul. 1987.

SARETZKI, Gabriele. Telomeres, Telomerase and Ageing. **Sub-cellular biochemistry**, v. 90, p. 221–308, 2018.

SCHAUBERGER, Philipp; WALKER, Alexander. **openxlsx: Read, Write and Edit xlsx Files**. **CRAN: Contributed Packages**, 21 abr. 2014.

SCHMIDT, Jens C.; CECH, Thomas R. Human telomerase : biogenesis, trafficking, recruitment, and activation. p. 1095–1105, 2015.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE. Boletim Epidemiológico – Perfil da Leishmaniose Tegumentar no Brasil (2021–2024). **Ministério da Saúde**, v. 56, n. 17, 2025.

SEKARAN, Vijay; SOARES, Joana; JARSTFER, Michael B. Telomere Maintenance as a Target for Drug Discovery. 2014.

SEKNE, Zala *et al.* Structural basis of human telomerase recruitment by TPP1-POT1. **Science**, v. 375, n. 6585, p. 1173–1176, 11 mar. 2022.

SERAFIM, Tiago D. *et al.* Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis, augmenting vector infectivity. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 548–555, 1 maio 2018.

SFEIR, Agnel; DE LANGE, Titia. Removal of Shelterin Reveals the Telomere End-Protection Problem. **Science**, v. 336, n. 6081, p. 593–597, 4 maio 2012.

SHANMUGASUNDRAM, Achchuthan *et al.* TriTrypDB: An integrated functional genomics resource for kinetoplastida. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 17, n. 1, p. e0011058, 19 jan. 2023.

SHEVCHENKO, Andrej *et al.* In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856–2860, 25 dez. 2006.

SHI, Yunhua *et al.* Abnormal SDS-PAGE migration of cytosolic proteins can identify domains and mechanisms that control surfactant binding. **Protein Science**, v. 21, n. 8, p. 1197–1209, 13 ago. 2012.

SHIBURAH, Mark E. *et al.* The absence of the *Leishmania major* telomerase TERT component links telomeres and cell homeostasis with infectivity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 323, p. 147036, set. 2025.

SINGH, Amar *et al.* Application of docking methodologies to modeled proteins. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 88, n. 9, p. 1180–1188, 20 set. 2020.

SINGH, Anupam *et al.* Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, p. 41, 25 dez. 2015.

SIQUEIRA NETO, J. L. *et al. Leishmania* replication protein A-1 binds in vivo single-stranded telomeric DNA. 2007.

SLOUKA, Christoph *et al.* Custom-made inclusion bodies: Impact of classical process parameters and physiological parameters on inclusion body quality attributes. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, 20 set. 2018.

SMITH, Eric M.; PENDLEBURY, Devon F.; NANDAKUMAR, Jayakrishnan. Structural biology of telomeres and telomerase. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 1, p. 61–79, 14 jan. 2020.

SMOGORZEWSKA, Agata; DE LANGE, Titia. Regulation of Telomerase by Telomeric Proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 177–208, jun. 2004.

SOOHOO, Christina Y. *et al.* Telomerase inhibitor PinX1 provides a link between TRF1 and telomerase to prevent telomere elongation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 5, p. 3894–3906, 4 fev. 2011.

SOWMYA, Gopichandran; BREEN, Edmond J.; RANGANATHAN, Shoba. Linking structural features of protein complexes and biological function. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 24, n. 9, p. 1486–94, set. 2015.

SRINIVAS, Nalini; RACHAKONDA, Sivaramakrishna; KUMAR, Rajiv. Telomeres and Telomere Length: A General Overview. **Cancers**, v. 12, n. 3, 28 fev. 2020.

STERKERS, Yvon *et al.* FISH analysis reveals aneuploidy and continual generation of chromosomal mosaicism in *Leishmania major*. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 274–283, fev. 2011.

SÝKOROVA, Eva; FAJKUS, Jirí. Structure—function relationships in telomerase genes _ Enhanced Reader.pdf. **Biology of the Cell**, v. 10, p. 375–392, 2009.

SZKLARCZYK, Damian *et al.* The STRING database in 2023: protein–protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. D1, p. D638–D646, 6 jan. 2023.

TAMURA, Koichiro; STECHER, Glen; KUMAR, Sudhir. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022–3027, 25 jun. 2021.

TASLIMI, Y.; ZAHEDIFARD, F.; RAFATI, S. Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches. **Parasitology**Cambridge University Press,, 1 abr. 2018.

THORVALDSDOTTIR, H.; ROBINSON, J. T.; MESIROV, J. P. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. **Briefings in Bioinformatics**, v. 14, n. 2, p. 178–192, 1 mar. 2013.

TIWARI, Prince; KAILA, Pallavi; GUPTASARMA, Purnananda. Understanding anomalous mobility of proteins on SDS-PAGE with special reference to the highly acidic extracellular domains of human E- and N-cadherins. **ELECTROPHORESIS**, v. 40, n. 9, p. 1273–1281, 12 maio 2019.

TOVCHIGRECHKO, A.; VAKSER, I. A. GRAMM-X public web server for protein-protein docking. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. Web Server, p. W310–W314, 1 jul. 2006.

TRIVEDI, Rakesh; NAGARAJARAM, Hampapathalu Adimurthy. Intrinsically Disordered Proteins: An Overview. **International Journal of Molecular Sciences**MDPI,, 1 nov. 2022a.

TUCEY, Timothy M.; LUNDBLAD, Victoria. Regulated assembly and disassembly of the yeast telomerase quaternary complex. p. 2077–2089, 2014.

TYANOVA, Stefka; TEMU, Tikira; COX, Juergen. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. **Nature Protocols**, v. 11, n. 12, p. 2301–2319, 27 dez. 2016.

ULIANA, Silvia R. B. *et al.* Structural and functional characterization of the *Leishmania amazonensis* ribosomal RNA promoter. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 76, n. 1–2, p. 245–255, fev. 1996.

VAN DER SPOEL, David *et al.* **GROMACS: Fast, flexible, and free**. **Journal of Computational Chemistry**, dez. 2005.

VANDESOMPELE, Jo *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. research0034.1, 18 jun. 2002.

VASCONCELOS, Elton J. R. *et al.* The putative *Leishmania* telomerase RNA (LeishTER) undergoes trans-splicing and contains a conserved template sequence. **PloS one**, v. 9, n. 11, p. e112061, 2014.

WALKER, John E. The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. **Biochemical Society Transactions**, v. 41, n. 1, p. 1–16, 1 fev. 2013.

WANG, Chong *et al.* **Plk1-mediated mitotic phosphorylation of PinX1 regulates its stability**. **European Journal of Cell Biology**, 2010.

WANG, Yaqiang; FEIGON, Juli. Structural biology of telomerase and its interaction at telomeres. **Current opinion in structural biology**, v. 47, p. 77–87, 1 dez. 2017.

WANG, Yaqiang; SUŠAC, Lukas; FEIGON, Juli. Structural biology of telomerase. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 11, n. 12, 1 dez. 2019.

WENG, Yue *et al.* PinX1 suppresses cancer progression by inhibiting telomerase activity in cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma. **Genes & Diseases**, v. 12, n. 2, p. 101319, mar. 2025.

WHEELER, Richard J.; GLUENZ, Eva; GULL, Keith. The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. **Molecular Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 647–662, fev. 2011.

WHO. Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030**. Geneva: World Health Organization (https://www.who.int/neglected_diseases/Revised-DraftNTD-Roadmap-23Apr2020.pdf)**. *[S.l.: S.n.]*.

WHO. **A sustainability framework for action against neglected tropical diseases: A framework for monitoring and evaluating progress of the road map for neglected tropical diseases 2021−2030**. *[S.l.: S.n.]*.

WICKHAM, Hadley. **ggplot2**. New York, NY: Springer New York, 2009.

WICKHAM, Hadley *et al.* dplyr: A Grammar of Data Manipulation. **CRAN: Contributed Packages**, 16 jan. 2014.

WICKHAM, Hadley; VAUGHAN, Davis; GIRLICH, Maximilian. **tidyr: Tidy Messy Data**. **CRAN: Contributed Packages**, 21 jul. 2014.

WIŚNIEWSKI, Jacek R. Quantitative Evaluation of Filter Aided Sample Preparation (FASP) and Multienzyme Digestion FASP Protocols. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 10, p. 5438–5443, 17 maio 2016.

WITTIG, Ilka; BRAUN, Hans-peter; SCHA, Hermann. Blue native PAGE. 2006.

WRIGHT, Peter E.; DYSON, H. Jane. **Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation**. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**Nature Publishing Group,, 22 dez. 2015.

XU, D.; TSAI, C. J.; NUSSINOV, R. Hydrogen bonds and salt bridges across protein-protein interfaces. **Protein Engineering Design and Selection**, v. 10, n. 9, p. 999–1012, 1 set. 1997.

XU, Yan. Chemistry in human telomere biology: Structure, function and targeting of telomere DNA/RNA. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 5, p. 2719–2740, 2011.

YONEKAWA, T.; YANG, S.; COUNTER, C. M. PinX1 Localizes to Telomeres and Stabilizes TRF1 at Mitosis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 32, n. 8, p. 1387–1395, 2012.

YOO, Jeong Eun; OH, Bong Kyeong; PARK, Young Nyun. Human PinX1 Mediates TRF1 Accumulation in Nucleolus and Enhances TRF1 Binding to Telomeres. **Journal of Molecular Biology**, v. 388, n. 5, p. 928–940, 22 maio 2009.

YOO, Jeong Eun; PARK, Toung Nyun; OH, Bong-Kyeong. PinX1 a telomere Repeat-binding Factor 1 (TRF1)-interacting Protein Maintains Telomere Integrity by Modulating TRF1 Homeostasis the Process in Which Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Plays Dual Roles. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, p. 6886–6898, 2014.

YOU, Dian *et al.* PinX1 plays multifaceted roles in human cancers: a review and perspectives. **Molecular Biology Reports**, v. 51, n. 1, p. 1163, 17 dez. 2024.

YUAN, Kai *et al.* PinX1 Is a Novel Microtubule-binding Protein Essential for Accurate Chromosome Segregation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 34, p. 23072–23082, ago. 2009.

ZHOU, Qing; HU, Huiqing; LI, Ziyin. New Insights into the Molecular Mechanisms of Mitosis and Cytokinesis in Trypanosomes. *In*: *[S.l.: S.n.]*. p. 127–166.

ZHOU, Xiao Zhen *et al.* The telomerase inhibitor PinX1 is a major haploinsufficient tumor suppressor essential for chromosome stability in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 4, p. 1266–1282, 1 abr. 2011.

ZHOU, Xiao Zhen; LU, Kun Ping. The Pin2/TRF1-Interacting Protein PinX1 Is a Potent Telomerase Inhibitor. **Cell**, v. 107, n. 3, p. 347–359, 2 nov. 2001.

ZHU, Yusheng *et al.* Telomerase RNA Accumulates in Cajal Bodies in Human Cancer Cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, n. 1, p. 81–90, jan. 2004.

ZINDER, John C. *et al.* Shelterin is a dimeric complex with extensive structural heterogeneity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 31, 2 ago. 2022.