

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 20/09/2023.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências

Departamento de Ciências Químicas e Biológicas

**PODERIAM OS PIROFOSFATOS DE INOSITOL TEREM
INFLUENCIADO O DESENVOLVIMENTO DO PARASITISMO
DENTRO DOS CINETOPLASTÍDEOS?**

Arthur de Oliveira Passos

Botucatu – SP
Março, 2023

Arthur de Oliveira Passos

**PODERIAM OS PIROFOSFATOS DE INOSITOL TEREM
INFLUENCIADO O DESENVOLVIMENTO DO PARASITISMO
DENTRO DOS CINETOPLASTÍDEOS?**

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Genética do Instituto de Biociências, UNESP, câmpus de Botucatu, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas – Genética.

Orientador: Dr. Marcelo Santos da Silva
Coorientador: Dr. Antônio Mauro Rezende

Botucatu – SP
Março, 2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Passos, Arthur de Oliveira.

Poderiam os pirofosfatos de inositol terem influenciado o desenvolvimento do parasitismo dentro dos cinetoplastídeos? / Arthur de Oliveira Passos. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Marcelo Santos da Silva

Coorientador: Antônio Mauro Rezende

Capes: 20202008

1. Parasitismo. 2. Fosfatos de inositol. 3. Leishmania. 4. Tripanosomatídeos. 5. Proteínas quinases.

Palavras-chave: Inositol pirofosfatos; Leishmania; Parasitismo; Quinases; Tripanosomatídeos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço o financiado deste trabalho pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – números de processo 2019/10753-2, 2020/10277-3 e 2021/05861-0. O presente trabalho foi realizado também com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço ainda aos colaboradores que nos ajudaram na realização de diversos ensaios presentes nesta dissertação, como os estudantes Bryan E. Abuchery (UNESP, Botucatu), Vitor L. da Silva (UNESP, Botucatu), Yete Gambarini Ferri (UNESP, Botucatu), Aleff F. Francisco (UNESP, Botucatu), e os docentes Dr. Antônio Mauro Rezende (Fiocruz-IAM), Simone G. Calderano (Instituto Butantan), profa. Dra. Maria Isabel Cano (UNESP, Botucatu), e prof. Dr. Marcos R. M. Fontes (UNESP, Botucatu).

Agradeço também meus amigos que me ajudaram neste processo, ajudando a enfrentar as adversidades encontradas no caminho.

Por fim agradeço minha namorada, Anielly, por todo apoio profissional e pessoal que me permitiu chegar onde estou hoje, podendo alcançar cada vez mais em minha trajetória.

Dedico este trabalho a minha mãe, Neusa, que desde cedo me ensinou o valor do conhecimento para se entender o mundo e que me mostrou, pelo seu exemplo, que não há limites para a busca de um sonho.

RESUMO

Em eucariotos modelo, pirofosfatos de inositol (PP-IPs) – principalmente os chamados IP₇ e IP₈ – estão envolvidos em uma ampla gama de processos celulares, como regulação do comprimento dos telômeros, morte celular programada, recombinação homóloga (HR), entre outros. No entanto, o mecanismo de ação e o envolvimento destes metabólitos em outras vias espécie-específicas ainda são questões abertas. IP₇ e IP₈ são sintetizados através de vias complementares que envolvem a participação das quinases IP6K e PP-IP5K. Tripanosomatídeos parasitas (e.g., *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp.) possuem um gene ortólogo para IP6K, mas aparentemente não possuem ortólogos para PP-IP5K, i.e., não sintetizam IP₈, o que os torna excelentes modelos para o estudo de IP₇. Além disso, estudos preliminares apontam que IP₈ está presente em organismos de vida livre da classe Kinetoplastea. Assim, esta dissertação consistiu inicialmente em investigar se a presença de IP₈ é mutuamente exclusiva em relação ao parasitismo dentro dos cinetoplastídeos. Para isso, realizamos análises evolutivas para confirmar a suposta perda da PP-IP5K em tripanosomatídeos. Reconstruímos árvores filogenéticas e obtivemos evidências robustas que confirmam a ausência de PP-IP5K em todos os tripanosomatídeos, exceto *Paratrypanosoma confusum*. As previsões das estruturas terciárias apontam que o domínio catalítico da PP-IP5K de *P. confusum* é naturalmente desestruturado, o que coloca em xeque sua função. Além disso, realizamos ensaios de dinâmica molecular com a PP-IP5K de *Bodo saltans* (BsPP-IP5K) e IP₇, que é utilizado como substrato (junto com cofator ATP) para síntese de IP₈. Nossas simulações sugerem que o BsPP-IP5K é totalmente capaz de sintetizar IP₈. Dessa forma, amplificamos o gene BsPP-IP5K e adicionamos a ele as regiões 3' e 5' UTR da Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH). Posteriormente, clonamos essa construção no vetor pSP72- α HYG α (Marc Ouellette lab), gerando um plasmídeo que fornece expressão constitutiva episomal de BsPP-IP5K em *Leishmania* spp. (episomal *knock-in*). Paralelamente, realizamos mutagênese sítio-dirigida para confirmar os resíduos de aminoácidos essenciais de BsPP-IP5K. A construção contendo a BsPP-IP5K mutada foi usada como controle nos ensaios *knock-in*. Com a inserção das construções em *Leishmania braziliensis*, realizamos a caracterização fenotípica das linhagens geradas, no qual, aparentemente, a presença da BsPP-IP5K não altera a proliferação e o ciclo celular. Futuramente, essas linhagens *knock-in* para PP-IP5-K serão utilizadas em ensaios de infecção para verificação da virulência e patogenicidade. Nossos achados até o momento sugerem que a transição de um estilo de vida livre para um estilo de vida parasitário resultou na perda de PP-IP5K. Os resultados deste trabalho poderão contribuir para a elucidação de novas rotas para o desenvolvimento de terapias antiparasitárias.

Palavras-chave: Parasitismo, tripanosomatídeos, inositol pirofosfatos, quinases, *Leishmania*

ABSTRACT

In model eukaryotes, inositol pyrophosphates (PP-IPs) – mainly IP₇ and IP₈ – are involved in a wide range of cellular processes, such as telomere length regulation, programmed cell death, homologous recombination (HR), among others. However, the mechanism of action and the involvement of these metabolites in other species-specific pathways are still open questions. IP₇ and IP₈ are synthesized through complementary pathways that involve the participation of IP6K and PP-IP5K kinases, respectively. Parasitic trypanosomatids (e.g., *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp.) have an ortholog gene for IP6K, but apparently lack orthologs for PP-IP5K, i.e., they do not synthesize IP₈, which makes them excellent models for the study of IP₇. Also, preliminary studies indicate that IP₈ is present in free-living organisms of the Kinetoplastea class. Thus, this project consists of investigating whether the presence of IP₈ is mutually exclusive in relation to parasitism within kinetoplastids. For this, we performed evolutionary analyzes to confirm the supposed loss of PP-IP5K in trypanosomatids. We reconstructed phylogenetic trees and obtained robust evidence confirming the absence of PP-IP5K in all trypanosomatids but *Paratrypanosoma confusum*. The predictions of tertiary structures indicate that the catalytic domain of *P. confusum* PP-IP5K is naturally unstructured, which calls into question its function. Also, we performed molecular dynamics assays with *B. saltans* PP-IP5K (BsPP-IP5K) and IP₇, which was used as a substrate (along with ATP) to synthesize IP₈. Our simulations suggested that the BsPP-IP5K is fully capable of synthesizing IP₈. Thus, we amplified the BsPP-IP5K gene and added to it the 3' and 5' UTR regions of Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH). Subsequently, we cloned this construct into the pSP72- α HYG α vector (Marc Ouellette lab), generating a plasmid that provides episomal constitutive expression of BsPP-IP5K in *Leishmania* spp. (*knock-in* episomal). In parallel, we performed site-directed mutagenesis to confirm the essential amino acid residues of BsPP-IP5K. The construct containing the BsPP-IP5K was used as a control in the knock-in assays. With the insertion of constructs in *Leishmania braziliensis*, we performed the phenotypic characterization of the generated lineages, in which, apparently, the presence of BsPP-IP5K does not alter proliferation and cell cycle. In the future, these knock-in strains for PP-IP5-K will be used in infection assays to verify virulence and pathogenicity. To date, our findings suggest that the transition from a free to a parasitic lifestyle resulted in the loss of PP-IP5K. The results of this work may contribute to the elucidation of new routes for the development of antiparasitic therapies.

Keywords: Parasitism, trypanosomatids, inositol pyrophosphates, kinases, *Leishmania*

ABREVIACOES

ATP – Adenosina Trifosfato

ADP - Adenosina Difosfato

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

bp – base pairs (pares de bases)

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reao em Cadeia da Polimerase)

GAPDH – Gliceraldedo 3-Fosfato Desidrogenase

HA – Hemaglutinina

IP₆ - Inositol hexakisfosfato

IP₆K – Inositol polyphosphate kinase

IP₇ – Inositol heptakisphosphate

IP₈ – Inositol octakisphosphate

KI – Knock-in

KO – Knockout

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NPT – Normal Pressure and Temperature

NVT – Normal Volume and Temperature

PP-IP₅K - Diphosphoinositol pentakisphosphate kinases

PP-IPs – Inositol Pyrophosphates

R_g – Radius of gyration

RMSD – Root-Mean-Square Deviation

RMSF – Root-Mean-Square Fluctuation

SDS-PAGE – Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis

PDB – Protein Data Bank

TEV protease – Tobacco Etch Virus protease

UTR – Untranslated region

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. Possível via para a síntese de PP-IPs mostrando os principais genes ortólogos correspondentes em <i>T. cruzi</i> (verde) e <i>L. braziliensis</i> (laranja).....	2
Figura 2. Ciclo de vida dos tripanosomatídeos <i>Leishmania</i> spp (A) e <i>T. cruzi</i> (B).....	4
Figura 3. Linha do tempo evolutiva dos eucariotos.....	5
Figura 4. Resultado da varredura de homólogos da PP-IP5K humana em tripanossomatídeos utilizando o pacote de software HMMer.....	17
Figura 5. Análise do domínio catalítico da PP-IP5K de diferentes organismos.....	18
Figura 6. Árvore filogenética para PP-IP5K utilizando abordagem de máxima verossimilhança ...	19
Figura 7. Modelo estrutural teórico gerado para BsPP-IP5K.....	20
Figura 8. Sobreposição do modelo teórico estrutural da BsPP-IP5K (salmão) com o molde cristalográfico da PP-IP5K humana (azul claro).....	21
Figura 9. Simulações em triplicata de 300 ns do complexo BsPP-IP5K + IP7 + ATP a 20 °C	22
Figura 10. Simulações em triplicata de 300 ns do complexo BsPP-IP5K + IP7 + ATP a 26 °C	22
Figura 11. Simulações usando BsPP-IP5K, IP7 e ATP apontam os resíduos de aminoácidos essenciais durante a catálise de IP ₈	23
Figura 12. Comparação do domínio catalítico entre BsPP-IP5K (cima) e HsPP-IP5K (baixo).....	24
Figura 13. Western blotting utilizando extrato proteico total de <i>T. cruzi</i> pTEX_Ø e pTEX+BsPP-IP5K.....	25
Figura 14. Esquema ilustrando a abordagem mutagênese sítio-dirigida.	26
Figura 15. Estratégia utilizada para realização de knock-in episomal em <i>L. braziliensis</i>	27
Figura 16. Confirmação de BsPP-IP5K em <i>L. braziliensis</i> transfectadas.....	28
Figura 17. Curva de crescimento de clones WT, pSP72αHYGα, BsPP-IP5K e BsPP-IP5K (K203G, K204G).....	28
Figura 18. Perfil do conteúdo de DNA das linhagens WT, pSP72αHYGα, BsPP-IP5K e BsPP-IP5K (K203G, K204G) na fase exponencial de crescimento.....	29
Figura 19. Construções realizadas visando a subclonagem de BsPP-IP5K em vetor de expressão pET28a+.....	30
Figura 20. Teste de expressão BsPP-IP5K em BL21 DE3 RP codon plus.....	31
Figura 21. Teste de expressão BsPP-IP5K em BL21 DE3 PLYS.....	32
Figura 22. Ensaio Western blot não detectou a expressão de BsPP-IP5K.....	32

LEGENDAS DAS TABELAS

Tabela 1. Iniciadores (<i>primers</i>) utilizando durante o desenvolvimento do projeto.....	11
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
Pirofosfatos de Inositol	1
Cinetoplastídeos	2
Tripanosomatídeos e PP-IPs	6
2. OBJETIVOS	7
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
Análises <i>in silico</i> e construção das árvores filogenéticas.....	7
Modelagem molecular e preparação dos complexos.....	9
Dinâmica Molecular	9
Síntese de BsPP-IP5K	10
Mutagênese sítio-dirigida na BsPP-IP5K.....	10
Cultivo de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> e formas promastigotas procíclicas de <i>L. braziliensis</i>	11
Subclonagem de BsPP-IP5K em vetor pTEX e transfecção em <i>T. cruzi</i> (knock-in episomal).....	12
Subclonagem de BsPP-IP5K em vetor pSP72 α HYG α e transfecção em <i>L. brazilliensis</i> (knock-in episomal).....	12
Preparação de bactérias competentes	13
Subclonagem de BsPP-IP5K em vetor pET28a+ e tentativas de expressão	13
Extração de proteínas totais de <i>L. braziliensis</i>	14
Western Blot.....	14
RT-PCR e qPCR para verificar e quantificar a expressão de BsPP-IP5K em parasitos selvagens transfectados.....	15
Curva de crescimento	15
Citometria de fluxo para avaliação do ciclo celular	16
5. RESULTADOS	16
PP-IP5K está presente nos genomas do tripanossomatídeo <i>Paratrypanosoma confusum</i> e do Bodonídeo <i>Bodo saltans</i>	16
PP-IP5K está presente em diversos grupos taxonômicos.....	18
BsPP-IP5K apresenta um domínio catalítico funcional	19
Knock-in episomal em <i>T. cruzi</i>	24
Mutagênese sítio-dirigida de BsPP-IP5K.....	25
Knock-in episomal em <i>L. braziliensis</i>	26
Crescimento e ciclo celular não apresentam alterações na presença de BsPP-IP5K.....	28
Expressão da BsPP-IP5K em sistema bacteriano.....	30
6. DISCUSSÃO	33
7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	35
8. PLANO DE GERENCIAMENTO DE DADOS	36
9. REFERÊNCIAS	36

de *L. braziliensis* expressando a PP-IP5K (*knock-in*) é um importante ponto de partida para melhor compreender a função dos PP-IPs nesse organismo e sua possível associação com virulência e patogenicidade. Futuramente, iremos quantificar os níveis de pirofosfatos de inositol nessa linhagem por HPLC e PAGE. Pretendemos também utilizar esta linhagem para realização de ensaios de infecção em células de macrófagos (humanos e murino) e, adicionalmente, realizar análises proteômicas para averiguar possíveis alterações nos níveis de proteínas comparado ao grupo controle.

Este trabalho abre possibilidade para novos estudos da atuação dos PP-IPs no parasitismo, com possibilidade da descoberta de novos alvos terapêuticos para fármacos antiparasitários. Outra eventual possibilidade é que, caso a linhagem *knock-in* para BsPP-IP5K apresente menor capacidade infectiva (infecção atenuada), será uma boa candidata para o desenvolvimento de uma vacina.

8. PLANO DE GERENCIAMENTO DE DADOS

Essa dissertação explora uma área da bioquímica e parasitologia molecular que até agora não foi estudada em detalhes. Assim, até a divulgação/publicação destes resultados, todos os dados obtidos estão sendo armazenados em cadernos de laboratório e no servidor do instituto (<https://ncc.unesp.br/gridunesp/docs/>), o que exige acesso pessoal. Posteriormente, pretendemos disponibilizar nossos dados brutos em repositórios públicos de acesso aberto, como o GitHub (<https://github.com/>).

9. REFERÊNCIAS

1. ADL, S. M.; SIMPSON, A. G.; LANE, C. E.; LUKES, J. et al. The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol*, 59, n. 5, p. 429-493, Sep 2012.
2. ALBALAT, R.; CANESTRO, C. Evolution by gene loss. *Nat Rev Genet*, 17, n. 7, p. 379-391, Jul 2016.
3. AN, Y.; JESSEN, H. J.; WANG, H.; SHEARS, S. B. et al. Dynamics of Substrate Processing by PPIP5K2, a Versatile Catalytic Machine. *Structure*, 27, n. 6, p. 1022-1028 e1022, Jun 4 2019.
4. AVILA, C. C.; MULE, S. N.; ROSA-FERNANDES, L.; VINER, R. et al. Proteome-Wide Analysis of *Trypanosoma cruzi* Exponential and Stationary Growth Phases Reveals a Subcellular Compartment-Specific Regulation. *Genes (Basel)*, 9, n. 8, Aug 15 2018.
5. AZEVEDO, C. et al. Inositol pyrophosphate mediated pyrophosphorylation of AP3B1 regulates HIV-1 Gag release. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 50, p. 21161–21166, 15 dez. 2009.
6. BENEKE, T.; MADDEN, R.; MAKIN, L.; VALLI, J. et al. A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids. *R Soc Open Sci*, 4, n. 5, p. 170095, May 2017.
7. BENJAMIN, B.; GOLDGUR, Y.; JORK, N.; JESSEN, H. J. et al. Structures of Fission Yeast Inositol Pyrophosphate Kinase Asp1 in Ligand-Free, Substrate-Bound, and Product-Bound States. *mBio*, 13, n. 6, p. e0308722, Dec 20 2022.
8. BLACK, J. A.; REIS-CUNHA, J. L.; CRUZ, A. K.; TOSI, L. R. O. Life in plastic, it's fantastic!

How *Leishmania* exploit genome instability to shape gene expression. *Front Cell Infect Microbiol*, 13, p. 1102462, 2023.

9. BLOM, D.; DE HAAN, A.; VAN DEN BURG, J.; VAN DEN BERG, M. et al. Mitochondrial minicircles in the free-living bodonid *Bodo saltans* contain two gRNA gene cassettes and are not found in large networks. *RNA*, 6, n. 1, p. 121-135, Jan 2000.
10. BOENIGK, J.; ARNDT, H. Bacterivory by heterotrophic flagellates: community structure and feeding strategies. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 81, n. 1/4, p. 465–480, 2002.
11. BONALDO, M. C.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *J Cell Biol*, 106, n. 4, p. 1349-1358, Apr 1988.
12. BURTON, P.; MCBRIDE, D. J.; WILKES, J. M.; BARRY, J. D. et al. Ku heterodimer-independent end joining in *Trypanosoma brucei* cell extracts relies upon sequence microhomology. *Eukaryot Cell*, 6, n. 10, p. 1773-1781, Oct 2007.
13. BUSSOTTI, G.; GOUZELOU, E.; CORTES BOITE, M.; KHERACHI, I. et al. *Leishmania* Genome Dynamics during Environmental Adaptation Reveal Strain-Specific Differences in Gene Copy Number Variation, Karyotype Instability, and Telomeric Amplification. *mBio*, 9, n. 6, Nov 6 2018.
14. CAPELLA-GUTIERREZ, S.; SILLA-MARTINEZ, J. M.; GABALDON, T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, 25, n. 15, p. 1972-1973, Aug 1 2009.
15. CHATREE, S.; THONGMAEN, N.; TANTIVEJKUL, K.; SITTICHAROON, C.; VUCENIK, I. Role of Inositols and Inositol Phosphates in Energy Metabolism. *Molecules*, v. 25, n. 21, p. 5079, 1 nov. 2020.
16. CHOI, J. H.; WILLIAMS, J.; CHO, J.; FALCK, J. R. et al. Purification, sequencing, and molecular identification of a mammalian PP-InsP5 kinase that is activated when cells are exposed to hyperosmotic stress. *J Biol Chem*, 282, n. 42, p. 30763-30775, Oct 19 2007.
17. CLAYTON, C. Regulation of gene expression in trypanosomatids: living with polycistronic transcription. *Open Biol*, 9, n. 6, p. 190072, Jun 28 2019.
18. CORDEIRO, C. D.; SAIARDI, A.; DOCAMPO, R. The inositol pyrophosphate synthesis pathway in *Trypanosoma brucei* is linked to polyphosphate synthesis in acidocalcisomes. *Mol Microbiol*, 106, n. 2, p. 319-333, Oct 2017.
19. COSTA, F. C.; FRANCISCO, A. F.; JAYAWARDHANA, S.; CALDERANO, S. G. et al. Expanding the toolbox for *Trypanosoma cruzi*: A parasite line incorporating a bioluminescence-fluorescence dual reporter and streamlined CRISPR/Cas9 functionality for rapid in vivo localisation and phenotyping. *PLoS Negl Trop Dis*, 12, n. 4, p. e0006388, Apr 2018.
20. SILVA, M. S. DA; CANO, M. I. N. *Molecular and Cellular Biology of Pathogenic Trypanosomatids*. Sharjah: Bentham Science Publishers, 2017.
21. DA SILVA, M. S.; MUNOZ, P. A. M.; ARMELIN, H. A.; ELIAS, M. C. Differences in the Detection of BrdU/EdU Incorporation Assays Alter the Calculation for G1, S, and G2 Phases of the Cell Cycle in Trypanosomatids. *J Eukaryot Microbiol*, 64, n. 6, p. 756-770, Nov 2017.
22. DA SILVA, M. S.; PAVANI, R. S.; DAMASCENO, J. D.; MARQUES, C. A. et al. Nuclear DNA Replication in Trypanosomatids: There Are No Easy Methods for Solving Difficult Problems. *Trends Parasitol*, 33, n. 11, p. 858-874, Nov 2017.
23. DA SILVA, R.; SACKS, D. L. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania*

promastigote virulence and attenuation. *Infect Immun*, 55, n. 11, p. 2802-2806, Nov 1987.

24. DALTON, A. C.; BARTON, W. A. Over-expression of secreted proteins from mammalian cell lines. *Protein Sci*, 23, n. 5, p. 517-525, May 2014.
25. DIAS, M. H.; FONSECA, C. S.; ZEIDLER, J. D.; ALBUQUERQUE, L. L. et al. Fibroblast Growth Factor 2 lethally sensitizes cancer cells to stress-targeted therapeutic inhibitors. *Mol Oncol*, 13, n. 2, p. 290-306, Feb 2019.
26. DOCAMPO, R.; HUANG, G. New insights into the role of acidocalcisomes in trypanosomatids. *J Eukaryot Microbiol*, 69, n. 6, p. e12899, Nov 2022.
27. EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.
28. FLEGONTOV, P.; VOTYPKA, J.; SKALICKY, T.; LOGACHEVA, M. D. et al. Paratrypanosoma is a novel early-branching trypanosomatid. *Curr Biol*, 23, n. 18, p. 1787-1793, Sep 23 2013.
29. GU, C.; LIU, J.; LIU, X.; ZHANG, H. et al. Metabolic supervision by PPIP5K, an inositol pyrophosphate kinase/phosphatase, controls proliferation of the HCT116 tumor cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118, n. 10, Mar 9 2021.
30. HORAKOVA, E.; FAKTOROVA, D.; KRAEVA, N.; KAUR, B. et al. Catalase compromises the development of the insect and mammalian stages of *Trypanosoma brucei*. *FEBS J*, 287, n. 5, p. 964-977, Mar 2020.
31. JACKSON, A. P.; OTTO, T. D.; ASLETT, M.; ARMSTRONG, S. D. et al. Kinetoplastid Phylogenomics Reveals the Evolutionary Innovations Associated with the Origins of Parasitism. *Curr Biol*, 26, n. 2, p. 161-172, Jan 25 2016.
32. JACKSON, A. P.; QUAIL, M. A.; BERRIMAN, M. Insights into the genome sequence of a free-living Kinetoplastid: *Bodo saltans* (Kinetoplastida: Euglenozoa). *BMC Genomics*, 9, p. 594, Dec 9 2008.
33. JADAV, R. S.; CHANDURI, M. V.; SENGUPTA, S.; BHANDARI, R. Inositol pyrophosphate synthesis by inositol hexakisphosphate kinase 1 is required for homologous recombination repair. *J Biol Chem*, 288, n. 5, p. 3312-3321, Feb 1 2013.
34. JIA, B.; JEON, C. O. High- recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open Biol*, 6, n. 8, Aug 2016.
35. KOSTYGOV, A. Y., KARNKOWSKA, A.; VOTÝPKA, J.; TASHYREVA, D.; MACISZEWSKI, K.; YURCHENKO, V.; & LUKEŠ, J. Euglenozoa: taxonomy, diversity and ecology, symbioses and viruses. *Open Biology*, v. 11, n. 3, mar. 2021.
36. KOZLOV, A. M.; DARRIBA, D.;throughput FLOURI, T.; MOREL, B. et al. RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics*, 35, n. 21, p. 4453-4455, Nov 1 2019.
37. KRIEG, P. A.; MELTON, D. A. In vitro RNA synthesis with SP6 RNA polymerase. *Methods Enzymol*, 155, p. 397-415, 1987.
38. LAFFITTE, M. N.; LEPROHON, P.; PAPADOPOULOU, B.; OUELLETTE, M. Plasticity of the *Leishmania* genome leading to gene copy number variations and drug resistance. *F1000Res*, 5, p. 2350, 2016.
39. LAHA, D.; JOHNEN, P.; AZEVEDO, C.; DYNOWSKI, M. et al. VIH2 Regulates the Synthesis of Inositol Pyrophosphate InsP8 and Jasmonate-Dependent Defenses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*,

27, n. 4, p. 1082-1097, Apr 2015.

40. LEE, S.; KIM, M. G.; AHN, H.; KIM, S. Inositol Pyrophosphates: Signaling Molecules with Pleiotropic Actions in Mammals. *Molecules*, 25, n. 9, May 8 2020.
41. MANTILLA, B. S.; AMARAL, L. D. D.; JESSEN, H. J.; DOCAMPO, R. The Inositol Pyrophosphate Biosynthetic Pathway of *Trypanosoma cruzi*. *ACS Chem Biol*, 16, n. 2, p. 283-292, Feb 19 2021.
42. MARAN, S. R.; DE LEMOS PADILHA PITTA, J. L.; DOS SANTOS VASCONCELOS, C. R.; MCDERMOTT, S. M. et al. Epitranscriptome machinery in Trypanosomatids: New players on the table? *Mol Microbiol*, 115, n. 5, p. 942-958, May 2021.
43. MITCHELL, G. C.; BAKER, J. H.; SLEIGH, M. A. Feeding of a Freshwater Flagellate, *Bodo saltans*, on Diverse Bacteria. *The Journal of Protozoology*, v. 35, n. 2, p. 219–222, maio 1988.
44. MOHANRAO, R.; MANORAMA, R.; GANGULI, S.; MADHUSUDHANAN, M. C. et al. Novel Substrates for Kinases Involved in the Biosynthesis of Inositol Pyrophosphates and Their Enhancement of ATPase Activity of a Kinase. *Molecules*, 26, n. 12, Jun 11 2021.
45. MORRISON, B. H.; BAUER, J. A.; KALVAKOLANU, D. V.; LINDNER, D. J. Inositol hexakisphosphate kinase 2 mediates growth suppressive and apoptotic effects of interferon-beta in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem*, 276, n. 27, p. 24965-24970, Jul 6 2001.
46. NAGATA, E.; LUO, H. R.; SAIARDI, A.; BAE, B. I. et al. Inositol hexakisphosphate kinase-2, a physiologic mediator of cell death. *J Biol Chem*, 280, n. 2, p. 1634-1640, Jan 14 2005.
47. NENAROKOVA, A.; ZAHONOVA, K.; KRASILNIKOVA, M.; GAHURA, O. et al. Causes and Effects of Loss of Classical Nonhomologous End Joining Pathway in Parasitic Eukaryotes. *mBio*, 10, n. 4, Jul 16 2019.
48. NGUYEN TRUNG, M.; FURKERT, D.; FIEDLER, D. Versatile signaling mechanisms of inositol pyrophosphates. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 70, p. 102177, 1 out. 2022.
49. OPPERDOES, F. R.; BUTENKO, A.; FLEGONTOV, P.; YURCHENKO, V. et al. Comparative Metabolism of Free-living *Bodo saltans* and Parasitic Trypanosomatids. *J Eukaryot Microbiol*, 63, n. 5, p. 657-678, Sep 2016.
50. OSADA, S.; KAGEYAMA, K.; OHNISHI, Y.; NISHIKAWA, J. et al. Inositol phosphate kinase Vip1p interacts with histone chaperone Asf1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Rep*, 39, n. 4, p. 4989-4996, Apr 2012.
51. PATTERSON, D. J.; LARSEN J. (EDS.). *The Biology of Free-living Heterotrophic Flagellates*. Oxford, New York: Oxford University Press, 1992.
52. PASCUAL-ORTIZ, M.; SAIARDI, A.; WALLA, E.; JAKOPEC, V. et al. Asp1 Bifunctional Activity Modulates Spindle Function via Controlling Cellular Inositol Pyrophosphate Levels in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*, 38, n. 9, May 1 2018.
53. PASCUAL-ORTIZ, M.; WALLA, E.; FLEIG, U.; SAIARDI, A. The PPIP5K Family Member Asp1 Controls Inorganic Polyphosphate Metabolism in *S. pombe*. *J Fungi (Basel)*, 7, n. 8, Jul 31 2021.
54. PASSOS-SILVA, D. G.; RAJAO, M. A.; NASCIMENTO DE AGUIAR, P. H.; VIEIRA-DARROCHA, J. P. et al. Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major*. *J Nucleic Acids*, 2010, p. 840768, Oct 4 2010.
55. PESESSE, X.; CHOI, K.; ZHANG, T.; SHEARS, S. B. Signaling by higher inositol polyphosphates. Synthesis of bisdiphosphoinositol tetrakisphosphate ("InsP8") is selectively

activated by hyperosmotic stress. *J Biol Chem*, 279, n. 42, p. 43378-43381, Oct 15 2004.

56. RAO, F.; CHA, J.; XU, J.; XU, R. et al. Inositol pyrophosphates mediate the DNA-PK/ATM-p53 cell death pathway by regulating CK2 phosphorylation of Tti1/Tel2. *Mol Cell*, 54, n. 1, p. 119-132, Apr 10 2014.
57. RAO, F.; XU, J.; FU, C.; CHA, J. Y. et al. Inositol pyrophosphates promote tumor growth and metastasis by antagonizing liver kinase B1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, n. 6, p. 1773-1778, Feb 10 2015.
58. RICO, E.; JEACOCK, L.; KOVAROVA, J.; HORN, D. Inducible high-efficiency CRISPR-Cas9-targeted gene editing and precision base editing in African trypanosomes. *Sci Rep*, 8, n. 1, p. 7960, May 21 2018.
59. SAIARDI, A.; BHANDARI, R.; RESNICK, A. C.; SNOWMAN, A. M. et al. Phosphorylation of proteins by inositol pyrophosphates. *Science*, 306, n. 5704, p. 2101-2105, Dec 17 2004.
60. SAIARDI, A.; CAFFREY, J. J.; SNYDER, S. H.; SHEARS, S. B. The inositol hexakisphosphate kinase family. Catalytic flexibility and function in yeast vacuole biogenesis. *J Biol Chem*, 275, n. 32, p. 24686-24692, Aug 11 2000.
61. SHEARS, S. B.; BAUGHMAN, B. M.; GU, C.; NAIR, V. S. et al. The significance of the 1-kinase/1-phosphatase activities of the PPIP5K family. *Adv Biol Regul*, 63, p. 98-106, Jan 2017.
62. SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T. J. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*, 7, p. 539, Oct 11 2011.
63. SIGALA, P. A.; CROWLEY, J. R.; HENDERSON, J. P.; GOLDBERG, D. E. Deconvoluting heme biosynthesis to target blood-stage malaria parasites. *Elife*, 4, Jul 14 2015.
64. SILVA, M. S. D.; VITARELLI, M. O.; SOUZA, B. F.; ELIAS, M. C. Comparative Analysis of the Minimum Number of Replication Origins in Trypanosomatids and Yeasts. *Genes (Basel)*, 11, n. 5, May 8 2020.
65. SIMPSON, A. G.; GILL, E. E.; CALLAHAN, H. A.; LITAKER, R. W. et al. Early evolution within kinetoplastids (euglenozoa), and the late emergence of trypanosomatids. *Protist*, 155, n. 4, p. 407-422, Dec 2004.
66. SIMPSON, A. G.; STEVENS, J. R.; LUKES, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol*, 22, n. 4, p. 168-174, Apr 2006.
67. TANAKA, A. K.; GORIN, P. A.; TAKAHASHI, H. K.; STRAUS, A. H. Role of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigote glycosphingolipids in macrophage infectivity. *Braz J Med Biol Res*, 40, n. 6, p. 799-806, Jun 2007.
68. TEIXEIRA, T. L.; CASTILHOS, P.; RODRIGUES, C. C.; DA SILVA, A. A. et al. Experimental evidences that P21 protein controls *Trypanosoma cruzi* replication and modulates the pathogenesis of infection. *Microb Pathog*, 135, p. 103618, Oct 2019.
69. PATTERSON, D. J.; LARSEN, J.; SYSTEMATICS ASSOCIATION. *The Biology of Free-living Heterotrophic Flagellates*. [s.l.] Clarendon Press, 1991.
70. WANG, H.; FALCK, J. R.; HALL, T. M.; SHEARS, S. B. Structural basis for an inositol pyrophosphate kinase surmounting phosphate crowding. *Nat Chem Biol*, 8, n. 1, p. 111-116, Nov 27 2011.
71. WILSON, M. S.; JESSEN, H. J.; SAIARDI, A. The inositol hexakisphosphate kinases IP6K1 and -2 regulate human cellular phosphate homeostasis, including XPR1-mediated phosphate export.

Journal of Biological Chemistry, v. 294, n. 30, p. 11597–11608, jul. 2019.

72. WUNDENBERG, T.; NALASKOWSKI, M. M.; LOSER, B.; FANICK, W. et al. A novel 6-pyrophosphorylating IP6 kinase (IP6-6K) discovered in the protozoon *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol*, 227, p. 53-63, Jan 2019.
73. YAGOUBAT, A.; CROBU, L.; BERRY, L.; KUK, N. et al. Universal highly efficient conditional knockout system in *Leishmania*, with a focus on untranscribed region preservation. *Cell Microbiol*, 22, n. 5, p. e13159, May 2020.