

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO

Wesley Klaysson Pereira Regatieri

**Caracterização bioquímica e funcional de
F-box like proteins (FLPs) em *Leishmania infantum***

São Carlos - SP

2026

Wesley Klaysson Pereira Regatieri

**Caracterização bioquímica e funcional de
F-box like proteins (FLPs) em *Leishmania infantum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira

São Carlos - SP

2026

Wesley Klaysson Pereira Regatieri

**Caracterização bioquímica e funcional de
*F-box like proteins (FLPs) em Leishmania infantum***

Dissertação apresentada em cumprimento às exigências do Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular. Área de concentração: Bioquímica.

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular e aprovado em sua forma final pela Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

____ / ____ / _____

Banca Examinadora:

Prof. Felipe Roberti Teixeira, Dr. (Orientador)
Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos.

Dr^a. Mariana Ferreira Silva (Examinadora externa)
University of Glasgow, UK.

Prof^a. Fernanda de Freitas Anibal, Dr^a. (Examinadora Interna)
Departamento de Morfologia e Patologia, Universidade Federal de São Carlos.

Dedicatória

Quem me conhece sabe o quão difícil é para mim me expressar, mas sinto-me na obrigação de dedicar algumas palavras àqueles que amo. A conclusão deste trabalho é resultado de muitos fatores que me permitiram chegar até aqui. Mesmo em meio a dificuldades e incertezas, tive ao meu lado pessoas que sempre estiveram presentes — ainda que, infelizmente, eu nem sempre tenha conseguido retribuir na mesma medida.

Ainda assim, tenho consciência de que, dentro das minhas condições, fiz o melhor que pude. Compreendi que, independentemente do conhecimento científico adquirido nesta jornada, nada supera o aprendizado mais valioso: aproveitar cada momento com quem nos faz feliz. No fim das contas, a vida é sobre isso, certo? Ser feliz ao lado daqueles que amamos.

Ao longo de todo esse período, sempre que surgia a pergunta “o que você é?”, nunca me ocorreu me definir, antes de tudo, como cientista. Vejo-me apenas como o Wesley: um garoto curioso acumulando alguns acertos em meio a tantos erros. Sei que o medo de errar faz parte da vida, mas, para mim, ele nunca foi um obstáculo; pelo contrário, foi justamente esse medo que me trouxe até aqui.

Enfim, dedico este trabalho às pessoas que mais amo e com quem tenho o privilégio de compartilhar o recurso mais precioso do mundo: o tempo. Agradeço aos meus pais, Raquel e Cláudio, pelo suporte e amor incondicional; aos meus irmãos, Wendel, Wilker e Werik, por sempre confiarem e acreditarem nos meus sonhos; e aos meus melhores amigos, Matheus e Douglas, que estiveram presentes diariamente, encurtando distâncias e tornando meus dias mais leves. Por fim, estendo minha gratidão aos membros do LBqC, que caminharam ao meu lado todos os dias, ensinando-me e ajudando-me a ser um Wesley melhor e, conseqüentemente, um cientista melhor.

Agradecimentos

Sempre que eu reler esta página, lembrarei dos sentimentos e momentos compartilhados com todas as pessoas que participaram desta jornada.

Dessa forma, agradeço imensamente,

- À Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, por tornar realidade o sonho de obter toda minha formação em uma instituição pública de ensino superior de qualidade inquestionável.
- Ao Departamento de Genética e Evolução – DGE, por fornecer todo o suporte físico para a realização dos meus experimentos.
- Ao meu orientador, Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira, pela orientação dedicada, sabedoria compartilhada e apoio constante ao longo deste percurso acadêmico.
- Aos integrantes da Banca Examinadora, Prof^ª. Dr^ª. Fernanda de Freitas Anibal e Dr^ª. Mariana Ferreira Silva, por sua generosa disponibilidade em participar deste momento. Suas valiosas contribuições, comentários e sugestões enriqueceram significativamente o aprimoramento deste trabalho.
- A todos os professores que, ao longo da minha graduação e pós-graduação, compartilharam seus conhecimentos, desempenhando um papel fundamental na minha formação profissional e pessoal.
- Aos membros do Laboratório de Bioquímica Celular (LBqC), em especial à Camila, pelo carinho, paciência, apoio e incentivo que recebi ao longo de todo este período. Vocês foram fundamentais para o sucesso desta jornada.
- Aos amigos e colegas da UFSCar, especialmente do DGE, pelo suporte e companheirismo.
- À FAPESP, pelo apoio financeiro ao projeto do Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira (Processo 2023/12058-5), incluindo bolsa e reserva técnica.
- A todas as pessoas extraordinárias que fizeram parte da minha jornada acadêmica de alguma forma, ao me incentivar e tornar possível a realização deste trabalho.

Meu mais sincero obrigado a todos!

“In the depth of winter, I finally learned that
within me there lay an invincible summer.”

Albert Camus

Summer

Resumo

A proteólise intracelular em eucariotos é mediada principalmente pelo Sistema Ubiquitina–Proteassoma (SUP), que envolve as enzimas E1, E2 e E3, sendo estas últimas responsáveis pelo reconhecimento dos substratos. Em protozoários parasitos, como *Leishmania infantum*, o SUP é essencial para adaptação ao ciclo de vida e sucesso do parasitismo, embora ainda seja pouco explorado, especialmente as E3 ubiquitina-ligases. Este estudo teve como objetivo caracterizar bioquimicamente e funcionalmente as proteínas F-box-like LinfFlp2 (*LINF_240015400*) e LinfFlp3 (*LINF_150014400*), adaptadores da E3 ubiquitina ligase LinfCRL1 de *L. infantum*. Parasitos expressando *LinfFLP2-HA* e *LinfFLP3-HA* foram submetidos à imunoprecipitação seguida de espectrometria de massas para identificação de proteínas associadas. Os interactomas revelaram 44 proteínas exclusivas para LinfFlp2, 125 para LinfFlp3 e 106 proteínas compartilhadas nos interactomas de LinfFlp2 e LinfFlp3, sugerindo redundância funcional. Para validação das interações em células HEK293T, os genes *Replication protein A subunit* (*LINF_280024500*), *RNA-binding protein 29 – putative* (*LINF_180007200*), *Leucine-rich repeat protein – putative* (*LINF_340011100*) e *Putative mitochondrial carrier protein* (*LINF_020012000*) foram clonados em vetores para expressão em células de mamíferos em fusão com myc no N-terminal. Ensaio de co-imunoprecipitação demonstraram que a proteína LRR é um potencial ligante de LinfFlp3. Em *L. infantum*, demonstramos através de CRISPR-Cas9 que as linhagens nocaute de *LinfFLP2* não resultou em impacto no crescimento promastigota, enquanto não foi possível obter o nocaute completo de *LinfFLP3*, sugerindo caráter essencial. A inserção de uma cópia de *LinfFLP3-HA* no locus 18S ribossomal do parasito e posterior nocaute das duas cópias genômicas resultou em linhagem viável (*DKO-LinfFLP3-HA*), reforçando a essencialidade deste gene para *L. infantum*. O nocaute de uma das cópias do gene *SKO LinfFLP3*, *DKO-LinfFLP3-HA* e *LinfFLP2-HA* não apresentou alteração significativa de crescimento e não observamos alteração nas fases do ciclo celular das linhagens *SKO-LinfFLP3* ou *DKO-LinfFLP3-HA*. Finalmente, análises de microscopia confocal demonstraram que LinfFlp2 e LinfFlp3 apresentam distribuição predominantemente citoplasmática granular e perinuclear com sutil localização nuclear. Em conjunto, os dados sugerem redundância funcional entre LinfFlp2 e LinfFlp3, ampliando a compreensão das LinfFlps na biologia de *L. infantum*.

Palavras-chave: *F-box like proteins; Leishmania infantum, Sistema ubiquitina proteassoma*

Abstract

Intracellular proteolysis in eukaryotes is primarily mediated by the Ubiquitin-Proteasome System (UPS), which involves E1, E2, and E3 enzymes, the latter being responsible for substrate recognition. In parasitic protozoa such as *Leishmania infantum*, the UPS is essential for life cycle adaptation and parasitic success, although it remains poorly explored, especially regarding E3 ubiquitin ligases. This study aimed to biochemically and functionally characterize the F-box-like proteins LinfFlp2 (LINF_240015400) and LinfFlp3 (LINF_150014400), which are adapters for the E3 ubiquitin ligase LinfCRL1 in *L. infantum*. Parasites expressing *LinfFLP2*-HA and *LinfFLP3*-HA were subjected to immunoprecipitation followed by mass spectrometry to identify associated proteins. The interactomes revealed 44 unique proteins for LinfFlp2, 125 for LinfFlp3, and 106 shared proteins, suggesting functional redundancy. For interaction validation in HEK293T cells, the genes *Replication protein A subunit* (LINF_280024500), *RNA-binding protein 29 – putative* (LINF_180007200), *Leucine-rich repeat protein – putative* (LINF_340011100), and *Putative mitochondrial carrier protein* (LINF_020012000) were cloned into vectors for mammalian cell expression with an N-terminal myc-tag. Co-immunoprecipitation assays demonstrated that the LRR protein is a potential ligand of LinfFlp3. In *L. infantum*, CRISPR-Cas9-mediated gene editing demonstrated that knockout of *LinfFLP2* resulted in no impact on promastigote growth, whereas it was not possible to obtain a complete knockout of *LinfFLP3*, suggesting its essential nature. The insertion of an *LinfFLP3*-HA copy into the parasite's 18S ribosomal locus, followed by the knockout of both genomic copies, resulted in a viable lineage (*DKO-LinfFLP3*-HA), reinforcing the essentiality of this gene for *L. infantum*. The knockout of a single allele of the *LinfFLP3* gene (*SKO*) showed no significant growth alteration, and no changes were observed in the cell cycle phases of the *LinfFLP2* knockout, *SKO-LinfFLP3*, or *DKO-LinfFLP3*-HA lineages. Finally, confocal microscopy analysis demonstrated that LinfFlp2 and LinfFlp3 exhibit a predominantly granular cytoplasmic and perinuclear distribution, with subtle nuclear localization. Together, these findings suggest functional redundancy between LinfFlp2 and LinfFlp3, expanding the understanding of LinfFlps in the biology of *Leishmania infantum*.

Keywords: *F-box like proteins; Leishmania infantum, Ubiquitin-proteasome system*

Lista de Ilustrações

Figura 1. O ciclo de vida dos parasitos <i>Leishmania</i>	17
Figura 2. Esquema geral do Sistema Ubiquitina Proteassoma	21
Figura 3. Classificação das E3 ligases.....	23
Figura 4. Esquema do complexo SCF1 composto pelas proteínas SKP1, Cullina1, RBX e F-box.....	24
Figura 5. Regulação do ciclo celular em mamíferos por E3 ubiquitina-ligases CRL1 e APC (<i>Anaphase Promoting Complex</i>).....	24
Figura 6. Estrutura quaternária do complexo SCF determinada por cristalografia.....	25
Figura 7. As proteínas <i>F-box-like</i> funcionam como adaptadores no complexo LinfCRL1, reconhecendo substratos por múltiplos mecanismos que podem atuar isoladamente ou de forma combinada	29
Figura 8. Imagem adaptada do site http://www.leishgedit.net/Home.html indicando os <i>primers</i> e vetores utilizados para a inserção do cassete de reparo no <i>locus</i> dos genes alvo	36
Figura 9. Mapa do vetor de expressão pLEXSY-neo2 (Cat. No. EGE-233) com sítios de clonagem para os genes-alvo, substituindo o fragmento <i>stuffer</i> de 1 kb.....	42
Figura 10. Clonagem dos genes de <i>LinfFLP2</i> e <i>LinfFLP3</i> com <i>tag</i> HA no pLEXSYneo2 e transfecção em <i>L. infantum</i>	47
Figura 11. Avaliação das linhagens <i>LinfFLP2-HA</i> e <i>LinfFLP3-HA</i>	48
Figura 12. Diagrama de Venn dos interactomas de LinfFlp2 e LinfFlp3, com 44 proteínas exclusivas de LinfFlp2, 125 exclusivas de LinfFlp3 e 106 compartilhadas.....	49
Figura 13. Interactoma de LinfFlp2 evidenciando a distribuição das proteínas identificadas em diferentes grupos funcionais.....	60
Figura 14. Interactoma de LinfFlp3 evidenciando a distribuição das proteínas identificadas em diferentes grupos funcionais.....	61
Figura 15. Interactoma das proteínas compartilhadas entre LinfFlp2 e LinfFlp3, evidenciando a distribuição dos alvos em diferentes grupos funcionais	62
Figura 16. Nocaute gênico de <i>LinfFLP2</i> e análise de crescimento	67
Figura 17. Nocaute gênico de <i>LinfFLP3</i> e análise de crescimento e ciclo celular de promastigotas.....	68
Figura 18. PCR de amplificação dos insertos e vetor linearizado	70

Figura 19. PCR de colônia para confirmação dos clones isolados de cada gene	70
Figura 20. Análise da expressão das proteínas parceiras fusionadas à <i>tag myc</i> em células de mamífero HEK293T	71
Figura 21. Ensaio de interação em células HEK293T entre a proteína LinfFlp2 com as <i>RNA-binding protein 29 (LINF_180007200)</i> , <i>Mitochondrial carrier protein (LINF_020012000)</i> , <i>Leucine-rich repeat protein (LINF_340011100)</i> e <i>Replication protein A subunit (LINF_280024500)</i>	72
Figura 22. Ensaio de interação em células HEK293T entre a proteína LinfFlp3 com as <i>RNA-binding protein 29 (LINF_180007200)</i> , <i>Mitochondrial carrier protein (LINF_020012000)</i> , <i>Leucine-rich repeat protein (LINF_340011100)</i> e <i>Poly(A)-binding protein 3 (LINF_250005800)</i>	73
Figura 23. Análise por microscopia confocal da localização subcelular de LinfFlp2 e LinfFlp3	75
Figura 24. Localização subcelular ao longo dos eixos XYZ por microscopia confocal de fluorescência.....	76

Lista de tabelas

Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados para nocaute dos genes alvos, disponíveis no sítio: http://www.leishgedit.net/Home.html	35
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados para validação de alterações genômicas induzidas pelo sistema CRISPR-Cas9 nos respectivos <i>loci</i> gênicos.	35
Tabela 3. Sequência dos <i>primers</i> para clonagem dos genes <i>LinfFLP2</i> e <i>LinfFLP3</i> com a <i>tag</i> HA (C-terminal) no vetor pLEXSYneo2	39
Tabela 4. Reação de PCR para amplificação dos genes <i>LinfFLP2</i> e <i>LinfFLP3</i>	39
Tabela 5. Ciclagem de PCR para amplificação dos genes <i>LinfFLP2</i> e <i>LinfFLP3</i>	40
Tabela 6. Reação de digestão dos genes <i>LinfFLP2</i> e <i>LinfFLP3</i> e do vetor pLEXSYneo2.	40
Tabela 7. Sequência dos <i>primers</i> utilizados para clonagem dos genes alvos e linearização do vetor.	45
Tabela 8. Proteínas associadas a <i>LinfFlp2</i> e <i>LinfFlp3</i> identificadas por imunoprecipitação seguida de espectrometria de massas.	49
Tabela 9. Seleção de genes para validação das interações nos interactomas de <i>LinfFLP2</i> e <i>LinfFLP3</i> , com base nos critérios estabelecidos.	69

Lista de abreviaturas

AdoMet	<i>S-adenosylmethionine</i>
Bp	Pares de base
BSA	Albumina sérica bovina
DKO	Duplo nocaute
DUB	Enzima deubiquitinase
Co-IP	Co-Imunoprecipitação
CRL	Cullin RING-ligases
E1	Enzima ativadora de ubiquitina
E2	Enzima conjugadora de ubiquitina
E3	Enzima ligante de ubiquitina
FBP	Proteína tipo F-box
FBS	Soro fetal bovino
FLP	<i>F-box like protein</i>
HECT	<i>Homologous to the E6AP Carboxyl Terminus</i>
HEK293T	Célula de rim embrionário humano
IB	<i>Imunoblotting (Western Blotting)</i>
IgG	Anticorpo do tipo imunoglobulina G
IP	Imunoprecipitação
kb	Quilobase
kDa	Quilodalton
LRR	<i>Leucine rich repeat</i>
LV	Leishmaniose visceral
MS	Espectrometria de massas
MAT	<i>Methionine adenosyltransferase</i>
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PTR1	Pteridina redutase 1
Rbx 1	RING-box protein 1
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>

Rpm	Rotações por minuto
SCF	Complexo formado pelas proteínas SKP1, Cullin e F-box
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SKO	<i>Single</i> nocaute
sgRNA	<i>Single guide RNA</i>
SKP1	<i>S-phase kinase-associated protein 1</i>
Tag	Epítopo específico
Tag-HA	Epítopo (YPYDVPDYA) derivado da hemaglutinina da gripe humana (HA), reconhecido pelo anticorpo anti-HA
Tag-myc	Epítopo (EQKLISEEDL) derivado gene C-MYC, reconhecido pelo anticorpo anti-myc
TBST	<i>Tris buffered saline with Tween</i>
SUP	Sistema Ubiquitina-Proteassoma
WB	<i>Western Blotting</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. – O parasito <i>Leishmania</i> e as leishmanioses.....	15
1.2. – Organização celular, regulação pós-transcricional e proteólise em <i>Leishmania infantum</i> ..	18
1.3. – Proteólise intracelular e Sistema Ubiquitina Proteassoma (SUP).....	20
1.4. – As E3 Ubiquitina-ligases e os complexos CRL1 ou SCF1	23
1.6. – Proteínas F-box: estrutura, função e diversidade	26
2. OBJETIVOS	32
2.1. – Objetivo geral	32
2.2. – Objetivos específicos	32
2.3. – Hipóteses	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. – Cultivo de promastigotas de <i>L. infantum</i>	33
3.2. – Nocaute gênico por CRISPR-Cas9	33
3.3. – Curva de crescimento de promastigotas	36
3.4. – Marcação de DNA para análise por citometria de fluxo	37
3.5. – Imunofluorescência em células de <i>Leishmania</i>	38
3.6. – Subclonagem dos genes <i>LinFLP2</i> e <i>LinFLP3</i> com tag <i>HA</i> no C- terminal no vetor <i>pLEXY-neo2</i>	39
3.7. – Purificação das proteínas parceiras de <i>LinFlp2-HA</i> e <i>LinFlp3-HA</i> nas linhagens de <i>L. infantum</i> por imunoprecipitação.....	42
3.8. – Preparação das amostras para análise por espectrometria de massas	43
3.9. – Análise por Nanoflow nLC-MS/MS	43
3.10. – Análise de dados brutos de LC-MS/MS	44
3.11. – Clonagem das proteínas parceiras selecionadas com tag <i>myc</i>	44
3.12. – Co-imunoprecipitação de células <i>HEK293T</i> transfectadas	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1. – Expressão dos genes <i>LinFLP2-HA</i> e <i>LinFLP3-HA</i> em <i>L. infantum</i>	46
4.2. – Identificação de ligantes de <i>LinFlp2-HA</i> e <i>LinFlp3-HA</i>	48
4.3- Análise funcional dos genes <i>LinFLP2</i> e <i>LinFLP3</i>	66
4.4. – Clonagem e avaliação de interação das proteínas parceiras identificadas nos interactomas de <i>LinFlp2</i> e <i>LinFlp3</i>	69
4.5. – Co-imunoprecipitação de células <i>HEK293T</i> transfectadas	71
4.6. – Localização intracelular das proteínas <i>LinFlp2-HA</i> e <i>LinFlp3-HA</i>	73
5. CONCLUSÃO	76
6. PROSPECÇÃO DE ARTIGOS CIENTÍFICOS	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
ANEXOS	81

1. INTRODUÇÃO

1.1. – O parasito *Leishmania* e as leishmanioses

A leishmaniose compreende um conjunto de doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos por flebotomíneos da subfamília *Phlebotominae*, com expressivo impacto em saúde pública e forte associação com pobreza, vulnerabilidades sociais e limitações estruturais de acesso ao diagnóstico e ao tratamento. No oriente, a transmissão ocorre principalmente por fêmeas do gênero *Phlebotomus*, enquanto no ocidente é atribuída a espécies do gênero *Lutzomyia*. A persistência da doença em regiões tropicais e subtropicais reflete não apenas aspectos biológicos do parasito e do vetor, mas também determinantes socioambientais que condicionam exposição, gravidade e desfechos clínicos¹. Estimativas globais indicam que a maioria dos casos permanece concentrada em países endêmicos, marcada por subnotificação, heterogeneidade regional e coexistência de cenários distintos de transmissão, reforçando seu enquadramento como doença tropical negligenciada². Nesse contexto, o Brasil destaca-se como o país com o maior número de casos de leishmaniose visceral nas Américas e figura entre aqueles com maior carga da doença em nível mundial, sendo responsável pela quase totalidade dos casos registrados no continente, o que evidencia sua relevância epidemiológica e a necessidade contínua de estratégias eficazes de vigilância e controle³.

Cerca de 20 espécies de *Leishmania* são reconhecidas como agentes etiológicos humanos. A forma tegumentar é dividida em cutânea e mucocutânea e está associada, no ocidente, a *L. mexicana* e *L. braziliensis*, e, no oriente, a *L. major* e *L. tropica*. A leishmaniose visceral (LV), forma mais grave da doença, é causada principalmente por *L. donovani* e *L. infantum*, sendo esta última o principal agente etiológico da LV no Brasil. A LV apresenta elevada letalidade quando não tratada e distribuição focal em áreas com transmissão sustentada⁴. A progressão clínica resulta da interação dinâmica entre carga parasitária, tropismo tecidual, resposta imune e mecanismos de evasão e persistência, não sendo determinada exclusivamente pela espécie infectante⁵.

A diversidade de desfechos clínicos decorre de uma rede complexa envolvendo fatores do parasito, vias de reconhecimento e inflamação no hospedeiro e mecanismos de persistência, evidenciando a leishmaniose como um sistema de alta complexidade biológica e translacional⁵. Assim, ao mesmo tempo em que a relevância social do problema motiva o desenvolvimento de estratégias diagnósticas e terapêuticas, a relevância científica reside em compreender como o parasito coordena mecanismos de sobrevivência e diferenciação

sob intensa pressão seletiva.

A dinâmica epidemiológica é fortemente influenciada por fatores ambientais e demográficos: urbanização desordenada, alterações ambientais, mobilidade populacional e diversidade de reservatórios e vetores contribuem para expansão ou reemergência em determinadas áreas, impondo desafios adicionais ao controle^{1,2,6}. Fatores como coinfeções, estado nutricional e acesso a tratamento modulam gravidade e mortalidade, particularmente na LV⁴. Esses elementos sublinham a importância social e biomédica do estudo da doença, especialmente de sua forma visceral.

Do ponto de vista biológico, o ciclo de vida de *Leishmania* envolve alternância entre duas formas principais: promastigotas flageladas no vetor e amastigotas com flagelo rudimentar no hospedeiro vertebrado (**Figura 1**). No intestino médio do flebotômíneo, promastigotas inicialmente procíclicas diferenciam-se em promastigotas metacíclicas, formas infectantes e não divisíveis. Essas formas acumulam-se na região do estômato e, durante o repasto sanguíneo, são regurgitadas juntamente com proteofosfoglicanos imunomoduladores e componentes salivares, favorecendo a transmissão ao hospedeiro mamífero. No hospedeiro, promastigotas metacíclicas são fagocitadas por diferentes células, mas principalmente pelos macrófagos, que constituem o principal nicho celular para a sobrevivência e replicação do parasito. A internalização ocorre de maneira frequentemente “silenciosa”, mediada por receptores do complemento e outros receptores fagocíticos, permitindo a entrada do parasito com mínima ativação inflamatória. Uma vez no interior dessas células, o parasito emprega diversos mecanismos de evasão da resposta imune, modulando a polarização de macrófagos e favorecendo um fenótipo alternativamente ativado (M2 ou M2-like), ao mesmo tempo em que suprime a ativação clássica do fenótipo M1, responsável pela resposta microbicida. Esse processo envolve a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12 e TNF- α , a redução da expressão de iNOS e da consequente produção de óxido nítrico, além do aumento de mediadores anti-inflamatórios, como IL-10 e TGF- β . Adicionalmente, moléculas de virulência do parasito, como o lipofosfoglicano (LPG) e a metaloprotease GP63, interferem em vias de sinalização intracelular do macrófago, contribuindo para a desativação de mecanismos efetores e para a manutenção de um ambiente permissivo à infecção⁷. Após a internalização, os promastigotas diferenciam-se em amastigotas, formas adaptadas ao ambiente ácido e oxidativo do fagolisossomo. As amastigotas replicam-se intracelularmente até promoverem lise celular e reinfeção de fagócitos locais. O ciclo se completa quando flebotômíneos ingerem células infectadas, permitindo

a reconversão das amastigotas em promastigotas no intestino do vetor⁵.

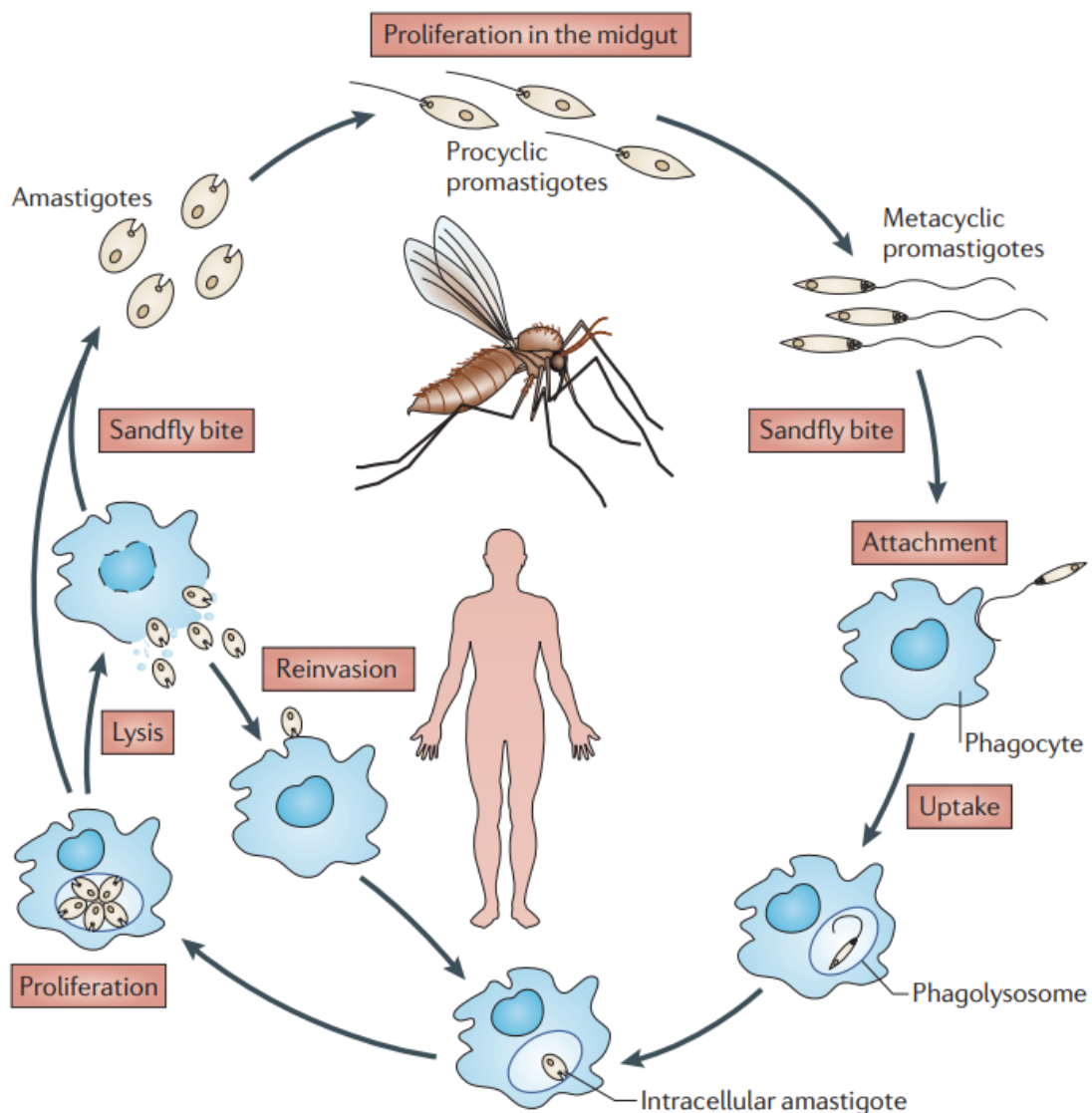


Figura 1. O ciclo de vida dos parasitos *Leishmania*. As promastigotas são encontradas dentro dos flebotomos e passam por diversas etapas de diferenciação morfológica, eventualmente se tornando em promastigotas metacíclicas infecciosas e não divisíveis, as quais são transmitidas durante a picada do flebotomo⁵.

Do ponto de vista clínico-epidemiológico, há ainda o desafio diagnóstico: relatos de quadros semelhantes à LV atribuídos a agentes fora do gênero *Leishmania* reforçam a necessidade de métodos moleculares robustos para confirmação etiológica em áreas endêmicas⁸. Como dito anteriormente, a *Leishmania infantum* é um dos principais agentes etiológicos da leishmaniose visceral e possui relevância particular nas Américas e na região do Mediterrâneo. No âmbito de genética populacional, tipagens por microssatélites em isolados do Novo Mundo indicam um padrão de baixa heterogeneidade entre

populações amostradas, compatível com origem recente no Velho Mundo e posterior introdução nas Américas⁹. Esse tipo de evidência é importante pois auxilia a compreender a dispersão geográfica e a estrutura populacional do parasito, e fornece base para discutir se e como eventos de introdução e expansão podem influenciar diversidade genética, adaptação local e potencial resposta a intervenções.

Apesar da disponibilidade de opções terapêuticas, persistem limitações importantes: toxicidade, necessidade de administração parenteral em determinados esquemas, longa duração do tratamento e variação de eficácia conforme forma clínica, espécie/cepa e região. Revisões sistemáticas destacam a crescente preocupação com resistência a fármacos, enfatizando fatores como uso inadequado e pressões seletivas e apontando a necessidade de elucidar mecanismos parasitários associados a falhas terapêuticas⁶. Análises mais recentes da farmacoterapia reforçam desafios relacionados à efetividade, toxicidade e implementação em distintos contextos epidemiológicos¹⁰. A racionalidade e os potenciais benefícios de terapias combinadas para LV, incluindo redução da duração do tratamento e mitigação do risco de resistência, têm sido discutidos, embora limitações operacionais persistam em diferentes regiões endêmicas¹¹.

Em conjunto, a relevância epidemiológica, a complexidade do ciclo de vida e as limitações terapêuticas sustentam a importância de investigar mecanismos moleculares essenciais de *Leishmania infantum*. A compreensão aprofundada de processos de adaptação, homeostase e regulação celular no parasito pode revelar vulnerabilidades exploráveis e fundamentar o desenvolvimento de intervenções mais eficazes e sustentáveis para a leishmaniose visceral.

1.2. – Organização celular, regulação pós-transcricional e proteólise em *Leishmania infantum*

Leishmania é um eucarioto unicelular da família *Trypanosomatidae* que apresenta um conjunto de estruturas especializadas relacionadas à motilidade, segregação de organelas e organização metabólica. A organização do citoesqueleto em tripanossomatídeos é singular quando comparada a eucariotos modelo, sustentando processos como morfogênese, divisão celular e adaptação estrutural durante desenvolvimento e estresse¹². Essas particularidades estruturais integram-se a adaptações metabólicas específicas, incluindo a presença de glicossomos.

Estudos sobre glicossomos mostram que a compartimentalização de vias metabólicas, notadamente etapas da glicólise, contribui para a regulação e organização

funcional do metabolismo, conferindo flexibilidade adaptativa ao parasito¹³. No contexto da alternância entre hospedeiros e nichos ambientais, essa plasticidade metabólica depende não apenas da regulação de vias, mas também de remodelação ativa do repertório proteico, implicando renovação e controle de qualidade de proteínas.

Em nível de expressão gênica, tripanossomatídeos exibem organização genômica em longas unidades policistrônicas e ausência de promotores convencionais para a maioria dos genes codificadores. A transcrição por RNA polimerase II é amplamente constitutiva, deslocando o controle diferencial para etapas pós-transcricionais; por isso, processamento de RNA, estabilidade de transcritos e regulação traducional assumem papel central^{14,15}. Mudanças de estágio e de condições ambientais são acompanhadas por reprogramações coordenadas predominantemente pós-transcricionais, frequentemente sem variações equivalentes nas taxas de transcrição, o que sugere que a remodelação do proteoma depende também de degradação seletiva de proteínas.

A adaptação ao ambiente do macrófago exige respostas integradas a pH ácido, aumento de temperatura, estresse oxidativo e mudanças nas fontes de carbono e nitrogênio; sinais como pH e temperatura estão associados à regulação do desenvolvimento e da viabilidade do parasito¹⁶. Análises proteômicas indicam que a diferenciação envolve extensas reprogramações metabólicas e alterações temporais na expressão proteica, implicando necessidade de remoção ativa de proteínas incompatíveis com o novo estágio e estabilização daquelas essenciais ao amastigota¹⁷.

Nesse contexto, a degradação regulada de proteínas constitui um eixo central de adaptação em *Leishmania*, especialmente num organismo com dependência limitada de regulação transcricional gene-específica. Sistemas de proteólise regulada oferecem arcabouço conceitual para entender como o parasito reorganiza rapidamente seu estado celular diante de mudanças ambientais abruptas.

A homeostase proteica envolve reconhecimento e remoção de proteínas mal dobradas, danificadas ou desnecessárias, prevenindo toxicidade e permitindo remodelação funcional. Em *Leishmania*, diferentes vias degradativas (autofagia, sistema lisossomal, SUP e via excretória¹⁸) e peptidases (cisteíno-peptidases, serino-peptidases, aspártico-peptidases e metaloproteases¹⁹) têm sido associadas à diferenciação e à virulência, compondo um repertório proteolítico relevante para adaptação e desenvolvimento²⁰. Do ponto de vista translacional, proteases do parasito são discutidas como potenciais alvos farmacológicos, reforçando a importância de compreender sistemas proteolíticos para desenvolvimento de fármacos²¹.

Em suma, essas evidências sustentam que a proteólise intracelular em *Leishmania* transcende a simples reciclagem molecular, sendo componente estrutural da biologia do parasito, com impacto direto sobre diferenciação, sobrevivência sob estresse e virulência. Em um cenário de regulação transcricional limitada e necessidade de remodelação proteômica rápida, mecanismos pós-transcricionais e pós-traducionais, incluindo degradação seletiva, emergem como determinantes centrais da adaptação e sobrevivência de *Leishmania infantum*.

1.3. – Proteólise intracelular e Sistema Ubiquitina Proteassoma (SUP)

A proteólise intracelular em eucariotos constitui componente central da homeostase celular, permitindo renovação contínua de proteínas e prevenção do acúmulo de espécies defeituosas. A eliminação seletiva de polipeptídeos mal dobrados ou danificados é essencial para evitar toxicidade proteica; o proteassoma 26S, maquinaria ATP-dependente, atua na proteção celular sob estresses como choque térmico e estresse oxidativo²². Assim, a proteólise regulada integra um sistema estruturado de controle de qualidade, não um processo inespecífico de degradação.

Em perspectiva ampliada, o SUP e a autofagia compõem redes integradas e frequentemente interdependentes para degradação de proteínas e organelas; a escolha entre vias depende de propriedades biofísicas de substratos, organização subcelular e contexto de estresse¹⁸. Além do papel no controle de qualidade, a degradação seletiva regula níveis de proteínas sinalizadoras e componentes de vias críticas, conferindo direcionalidade e irreversibilidade a transições biológicas, papel historicamente consolidado do SUP em ciclo celular, regulação de fatores de transcrição e implicações em doenças e desenvolvimento de fármacos²³.

Os princípios de proteostase e degradação seletiva são amplamente conservados evolutivamente, sustentando a capacidade de eucariotos responderem a danos e variações ambientais. Essa conservação reforça a plausibilidade de investigar vias de proteólise em protozoários parasitos, pois mecanismos essenciais e conservados podem representar pontos de vulnerabilidade funcional e potenciais alvos terapêuticos.

O SUP é o principal mecanismo de proteólise regulada em eucariotos, operando por conjugação sequencial de ubiquitina (Ub) a proteínas-alvo e subsequente direcionamento ao proteassoma 26S (**Figura 2**). A Ub (76 aminoácidos) liga-se ao grupo ϵ -amino de lisinas internas ou ao N-terminal do substrato; em reação ATP-dependente, a enzima E1 (*Ubiquitin Activating Enzyme*) ativa Ub, que é transferida a E2 (*Ubiquitin*

Conjugating Enzyme) e, finalmente, recombinada via E3 ligases, responsáveis por reconhecer o substrato e catalisar a transferência de Ub. A modificação pode ser mono ou poliubiquitinação, destinando o substrato à degradação proteassomal ou modulando funções não proteolíticas. Por sua vez a reversibilidade é assegurada pelas deubiquitinases (DUBs) que removem ubiquitinas, regulando o ciclo²⁴.

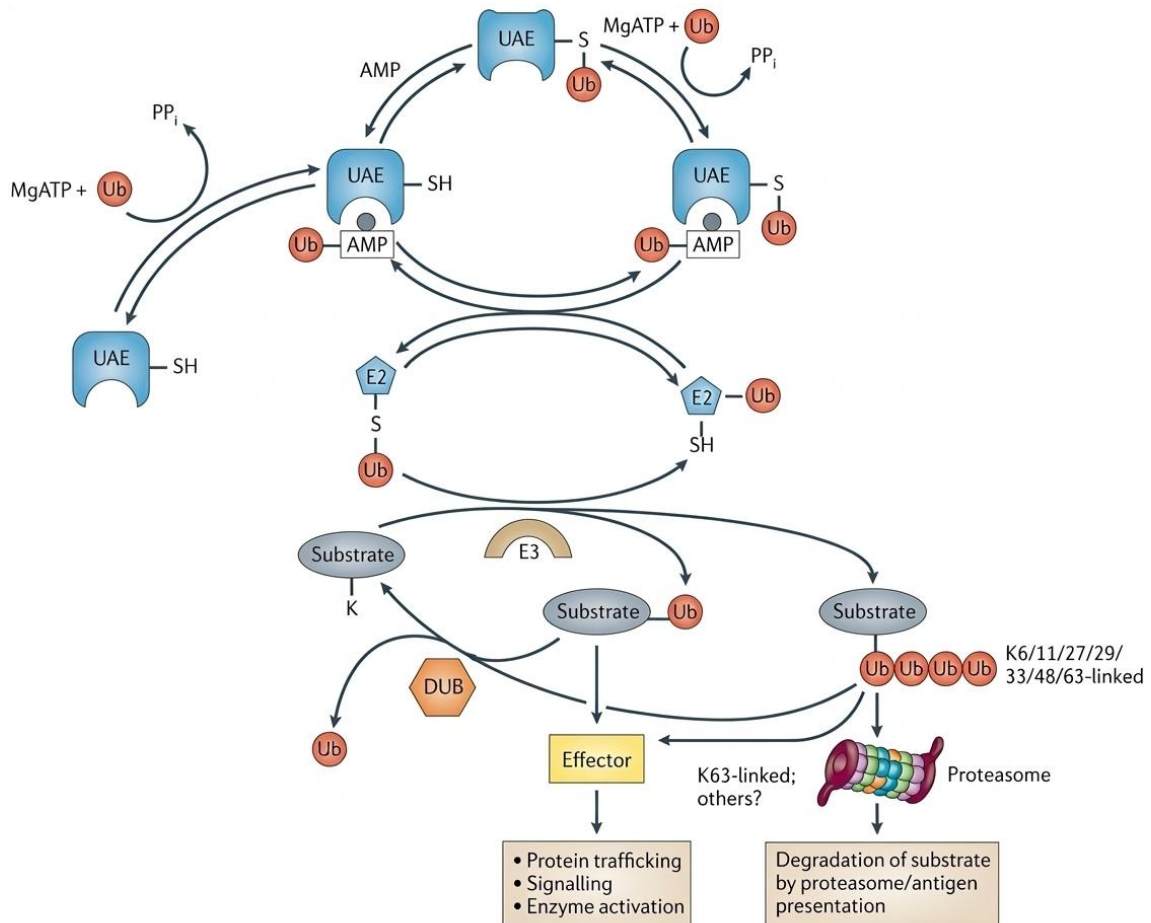


Figura 2. Esquema geral do Sistema Ubiquitina Proteassoma. As enzimas E1 (UAE), E2 e as E3 ubiquitina-ligases catalisam a ubiquitinação do substrato-alvo. Esta modificação pós-traducional no substrato ocasiona a degradação pelo proteassoma ou modulação de função. Esse processo é reversível devido a atividade das enzimas DUBs, que removem as ubiquitinas dos substratos. Fonte: Figura adaptada de Bedford et al (2011)²⁵.

Embora classicamente associada à degradação, o SUP exerce funções regulatórias amplas em ciclo celular, sinalização, crescimento, resposta ao estresse e diferenciação²³. Em *Leishmania*, o SUP assume relevância especial diante da necessidade de rápida remodelação proteômica ao longo do ciclo de vida (promastigotas no vetor para

amastigotas intracelulares). Evidências experimentais mostram que a atividade proteossomal é requerida para crescimento de promastigotas e sobrevivência de amastigotas, inibidores como *lactacystin* comprometem crescimento e viabilidade²⁶, e inibidores seletivos do proteossoma (ex.: LXE408) têm sido avaliados como candidatos terapêuticos contra leishmanioses e outras doenças causadas por tripanossomatídeos²⁷.

Estudos em diferentes espécies demonstram regulação dependente do SUP em proteínas específicas (p. ex. LmjKIN13-1 em *L. major*; PTR1 em *L. donovani*), sugerindo participação direta do sistema na regulação do ciclo celular e metabolismo. Análises genômicas e funcionais em *L. mexicana* identificaram repertório extenso de E1, E2, E3 e DUBs requeridos para proliferação, diferenciação de promastigota em amastigota e manutenção da infecção; enzimas como UBC1/CDC34, UBC2, UEV1 e ligases HECT foram associadas à diferenciação, enquanto UBA1b e outras E2/E3 são cruciais para proliferação em modelos animais. DUBs específicas também mostram papel crítico em viabilidade e progressão do ciclo de vida²⁸.

Particularmente relevante são as diferenças estruturais entre componentes do UPS de tripanossomatídeos e ortólogos humanos: estudos com E1 de *Trypanosoma brucei* indicam que inibidores potentes da E1 humana (TAK-243) nem sempre inibem a enzima do parasito, sugerindo oportunidade de seletividade baseada em particularidades estruturais. Além disso, investigações em tripanossomatídeos indicam diferenças estruturais em componentes centrais da via, abrindo perspectivas para seletividade farmacológica. A identificação de duas isoformas de UBA1 (E1 ativadora de ubiquitina) nesses organismos, em contraste com o único gene descrito em mamíferos e leveduras, bem como a resistência diferencial a inibidores da UBA1 humana, reforça a plausibilidade de estratégias de inibição seletiva nessa etapa da via²⁹. No genoma de *L. infantum*, foram identificados ortólogos de SKP1, Cullin 1 e RBX1, com graus variáveis de identidade em relação a proteínas humanas e conservação de resíduos críticos de interação, sustentando plausibilidade estrutural de complexos CRL1/SCF nesse parasito³⁰. Contudo, proteínas F-box ortólogas às humanas não foram identificadas, indicando que *Leishmania* pode possuir F-box divergentes ou estruturalmente atípicas, potencialmente responsáveis por especificidade funcional adaptada à sua biologia.

Essas evidências apontam que o SUP em *Leishmania* não só mantém homeostase proteica global, mas participa ativamente na regulação de diferenciação, metabolismo e infectividade; a combinação de conservação central e diferenças estruturais estratégicas

posiciona o sistema como eixo de vulnerabilidade biológica e plataforma promissora para investigação de alvos terapêuticos.

1.4. – As E3 Ubiquitina-ligases e os complexos CRL1 ou SCF1

As E3 ubiquitina-ligases conferem especificidade ao SUP ao reconhecer substratos e catalisar transferência de Ub da E2 para a proteína-alvo. Estruturalmente, as E3 dividem-se em 4 famílias baseadas nos domínios de interação com as enzimas E2: a HECT (*Homologos to E6 Associated Protein*), RING (*Really Interesting New Gene*), U-box e RBR (*RING between RING*) (**Figura 3**). Elas possuem mecanismo de transferência de ubiquitina, especificidade a substratos e regulação diferentes³¹.

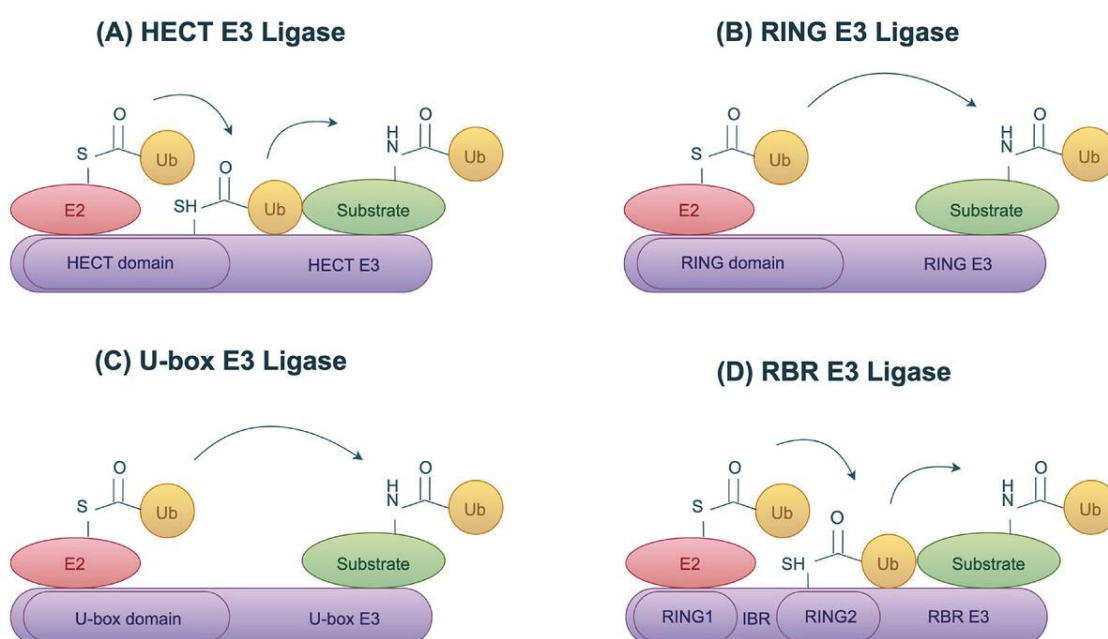


Figura 3. Classificação das E3 ligases. As E3 são classificadas em quatro principais isoformas com base nos domínios de interação com as enzimas E2, sendo elas: tipo HECT (A), tipo RING finger (B), tipo U-box (C) e tipo RBR (D) (Fonte: Wang, 2025³²).

Entre as RING, as Cullin-RING ligases (CRLs) ou SCF (SKP1, Cullin 1 e F-box protein) são complexos multiproteicos organizados em torno da proteína Cullin 1 que funciona como um *scaffold* do complexo, associada ao C-terminal com a proteína RING-box (RBX) e ao N-terminal a proteína SKP1 que se ligam às proteínas F-box que reconhecem o substrato a ser ubiquitinado (**Figura 4**). Nos complexos CRL1 (SCF: F-box-SKP1-Cullin1-RBX) a Cullin1 organiza espacialmente o módulo catalítico (RBX/E2-Ub) e o módulo de reconhecimento (SKP1-F-box), permitindo que diferentes proteínas F-box definam a especificidade do complexo. As F-box interagem com SKP1

via domínio F-box e reconhecem substratos por domínios acessórios (LRR, WD, etc.), conferindo ao SCF ampla plasticidade funcional, particularmente em controle do ciclo celular e regulação de vias de sinalização.

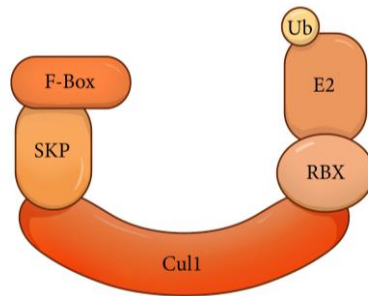


Figura 4. Esquema do complexo SCF1 composto pelas proteínas SKP1, Cullina1, RBX e F-box (Autoria própria).

As CRL1 nas células de mamíferos desempenham diversas funções, especialmente no ciclo celular, dado que a degradação de diversas proteínas relacionadas à regulação das diferentes fases do ciclo celular é realizada pelas proteínas Fbx11 (também denominada de SKP2), Fbxw7 e Fbxw1a (também conhecida como β TRCP) (**Figuras 5A e B**). Além das CRL1, as E3 ligases APC/C também desempenham papel essencial na regulação do ciclo celular levando a degradação de diferentes substratos reguladores deste processo (**Figura 5A**). A regulação de outras vias de sinalização intracelulares também é realizada pelas CRLs, como por exemplo nas vias NF- κ B (β -catenin), desenvolvimento (Notch 1/4), metabolismo (FOXO1), resposta imune antiviral (Viral E7, Viral Vpu), diferenciação, entre outras³³.

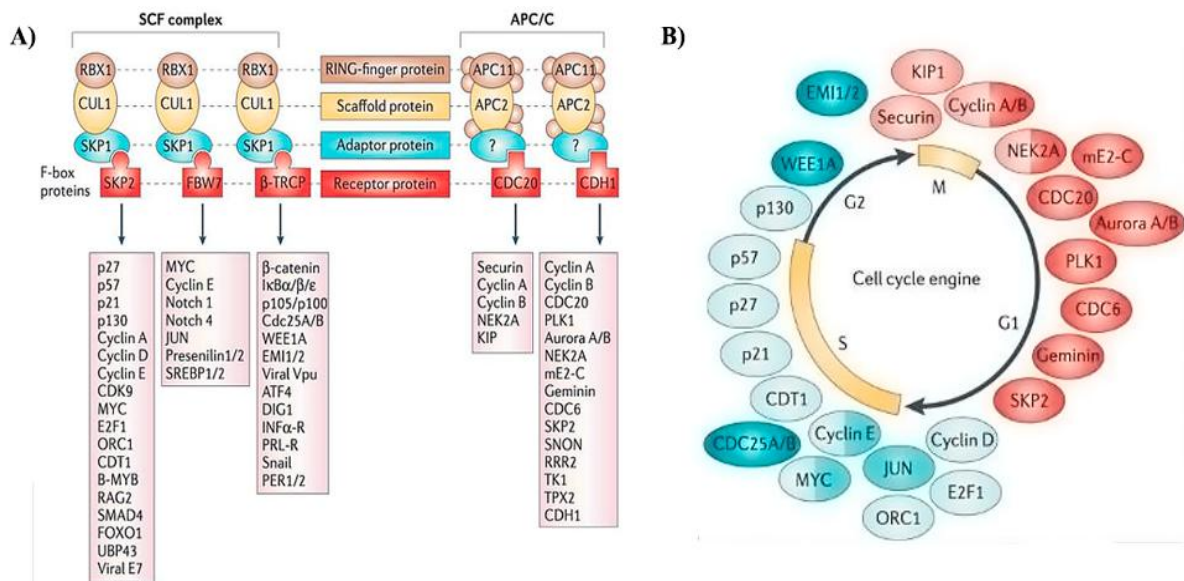


Figura 5. Regulação do ciclo celular em mamíferos por E3 ubiquitina-ligases CRL1 e APC (*Anaphase Promoting Complex*). A) Em destaque estão as proteínas E3 ligases

APC e as CRL1 com suas diversas proteínas F-box e seus substratos já descritos na literatura. B) Em azul e vermelho estão as proteínas do ciclo celular que são degradadas, respectivamente, pelo CRL1 e APCs durante as fases do ciclo celular Fonte: Figura adaptada de Nakayama (2006)³³.

Estudos estruturais detalharam a interface entre Skp1 e uma proteína F-box, como Skp2, bem como a organização geral do complexo SCF, demonstrando que o posicionamento espacial entre o substrato e a enzima conjugadora de ubiquitina (E2) determina a eficiência da ubiquitinação. Esses estudos revelaram que a proteína Cullin-1 atua como um andaime molecular rígido que organiza os módulos de reconhecimento de substrato (Skp1–F-box) e catalítico (Rbx1–E2), garantindo a proximidade e a orientação adequadas para a transferência da ubiquitina. Assim, as proteínas F-box não apenas recrutam o substrato, mas também contribuem para seu posicionamento ótimo, permitindo que resíduos de lisina específicos sejam corretamente apresentados ao sítio ativo da E2. Esse arranjo estrutural assegura a eficiência e a especificidade da reação de ubiquitinação, evidenciando que a atividade do complexo SCF depende criticamente de sua arquitetura tridimensional^{34,35} (**Figura 6**).

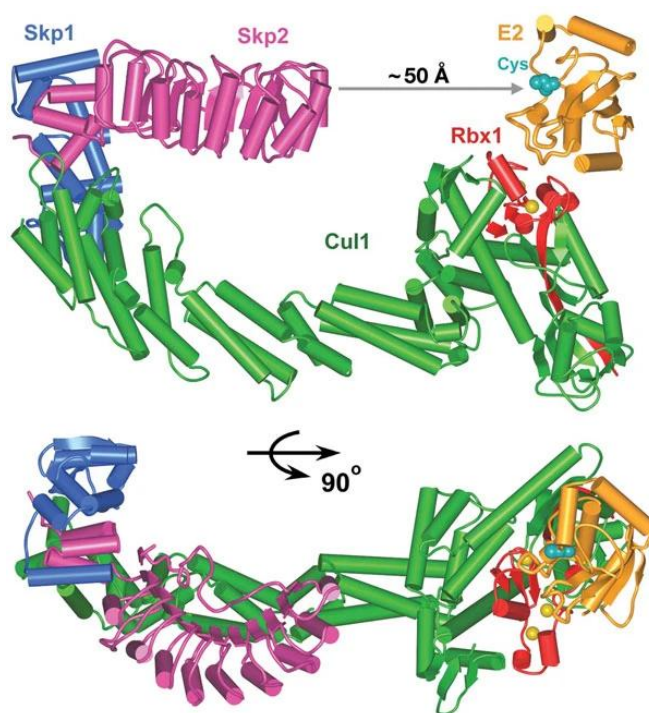


Figura 6. Estrutura quaternária do complexo SCF determinada por cristalografia. Cul1, Rbx1, Skp1, Skp2 e uma E2 estão coloridos em verde, vermelho, azul, magenta e laranja, respectivamente. A cisteína do sítio ativo da E2, onde a ubiquitina estaria covalentemente ligada, é mostrada em representação de preenchimento espacial e colorida em ciano. A seta cinza indica a lacuna de 50 Å entre a extremidade do domínio de repetições ricas em leucina de Skp2 e o sítio ativo da E2 (Fonte: Schulman, 2000)³⁴.

Nosso grupo caracterizou funcionalmente a classe LinfCRL1 de *Leishmania*. Foram identificados em *L. infantum* os genes *LINF 110018100* (*SKP1-like-protein*), *LINF 240029100* (*Cull-like protein*) e *LINF 210005300* (*RBX1 putative*). As identidades com os ortólogos humanos foram aproximadamente 63% (SKP1), 21% (CUL1) e 67% (RBX1), e esses ortólogos também aparecem em outras espécies de *Leishmania*. Apesar da baixa identidade global de CUL1, resíduos críticos para as interfaces SKP1–CUL1 e CUL1–RBX1 são conservados, sugerindo manutenção estrutural do complexo. Além disso, modelagens por AlphaFold indicaram alta similaridade estrutural entre LinfSkp1/LinfCul1/LinfRbx1 e seus ortólogo humanos. A superposição do complexo LinfCRL1 com o CRL1 humano mostrou topologia preservada, com CUL1 atuando como arcabouço, ligando SKP1 no N-terminal e RBX1 no C-terminal³⁰. Ensaio de co-precipitação em HEK293T mostraram interação cruzada entre proteínas de *L. infantum* e humanas (por exemplo, LinfSkp1 com proteína humana contendo domínio F-box e com CUL1 humano; LinfCul1 com SKP1 e RBX1 humanos). A co-precipitação de LinfSkp1, LinfCul1 e LinfRbx1 demonstrou que as três proteínas formam um complexo LinfCRL1 funcional³⁰. Do ponto de vista funcional, os nocautes de *LinfSKP1* e *LinfRBX1* não gerou linhagens viáveis, indicando essencialidade desses componentes. O nocaute de *LinfCUL1* foi viável, porém com redução de proliferação, alterações no ciclo celular e aumento de formação de rosetas, sugerindo papel central em crescimento e organização celular. Análise de conteúdo de DNA por citometria revelou acúmulo de células em fases tardias de S e G2/M no nocaute de *LinfCUL1*, com redução da fração em G1/G0. Isso sugere que LinfCul1 regula a progressão da fase S e possivelmente a transição de S tardia para G2³⁰. Esses achados estabelecem que *L. infantum* possui um CRL1 funcional, com parceiros F-box e atividade de transferência de ubiquitina, associado a processos celulares essenciais. Esses componentes do SUP podem representar alvos potenciais para intervenções contra leishmaniose visceral.

1.6. – Proteínas F-box: estrutura, função e diversidade

As proteínas F-box constituem uma família de 68 adaptadores moleculares em humanos que conferem especificidade de reconhecimento de substratos aos complexos de E3 ubiquitina ligase do tipo SCF/CRL1 (Skp1–Cullin1–Rbx1–F-box). Essas proteínas compartilham um motivo conservado de aproximadamente 48 aminoácidos (sequência consenso), denominado domínio F-box, geralmente localizado na região N-terminal, responsável pela interação direta com SKP1 e pelo consequente recrutamento à

plataforma estrutural formada por Cullin1 e Rbx1³⁶. Esse arranjo estabelece a conexão física entre o arcabouço catalítico da ligase e proteínas-alvo específicas, posicionando as F-box como receptores de substrato dentro do complexo. A identificação de numerosos membros contendo o domínio F-box revelou o amplo potencial de diversificação funcional do sistema SCF, permitindo a regulação seletiva da estabilidade de múltiplas proteínas celulares, particularmente aquelas envolvidas no controle do ciclo celular, na sinalização e na manutenção da homeostase proteica.

O avanço das análises estruturais e bioinformáticas demonstrou que, além do domínio F-box conservado, essas proteínas apresentam regiões C-terminais altamente variáveis que contêm domínios responsáveis pelo reconhecimento direto dos substratos. Essa modularidade estrutural do domínio F-box para interação com SKP1 acoplado a domínios acessórios de ligação ao substrato constitui o principal determinante da especificidade funcional dos diferentes complexos SCF. Com base nessas regiões adicionais, as proteínas F-box foram organizadas em subclasses, incluindo FBXL (contendo repetições ricas em leucina), FBXW (contendo repetições WD40 ricas em triptofano) e FBXO (proteínas com domínios diversos ou ainda não caracterizados). Em organismos modelo, essa arquitetura permite que dezenas a centenas de F-box distintas recrutem conjuntos específicos de substratos, conferindo ao SUP elevada seletividade e amplo alcance regulatório³⁷.

A análise comparativa das sequências do domínio F-box ao longo da evolução eucariótica indica que essa família passou por expansão e diversificação significativas, associadas a eventos de duplicação gênica, reorganização de domínios e aquisição de novos módulos estruturais³⁷. Estudos sistemáticos demonstraram que as proteínas F-box constituem uma ampla superfamília multigênica, cujo aumento no número de membros ocorreu principalmente por eventos de duplicação seguidos de divergência funcional. Esse processo evolutivo ampliou a complexidade funcional do SUP, possibilitando que diferentes proteínas F-box reconheçam *degrons* específicos presentes em proteínas-alvo. Frequentemente, esses *degrons* tornam-se acessíveis ou funcionalmente ativos em resposta a modificações pós-traducionais, especialmente a fosforilação (**Figura 7**)³⁸. Assim, o reconhecimento dependente de fosforilação permite que sinais transitórios mediados por quinases e fosfatases sejam convertidos em respostas robustas, como ubiquitinação e, muitas vezes, degradação proteica^{24,38}. Esse mecanismo vincula a decisão de ubiquitinação ao estado conformacional e ao padrão de modificações da

proteína-alvo, reduzindo eventos de ubiquitinação indevida e aumentando a precisão do controle celular.

Nesse contexto, a ubiquitinação deve ser compreendida não apenas como um mecanismo de reciclagem proteica, mas como um código molecular regulatório capaz de direcionar tanto a degradação quanto funções não proteolíticas das proteínas modificadas. Historicamente, a degradação seletiva mediada por SCF consolidou-se como um eixo central de regulação celular, integrando controle temporal, qualidade proteica e sinalização intracelular²³. Em conjunto, a conservação estrutural do domínio F-box, aliada à diversidade dos domínios de reconhecimento de substrato e à integração com sinais pós-traducionais, sustenta a ampla diversidade funcional dessa família, posicionando as proteínas F-box como elementos centrais na arquitetura e na dinâmica regulatória das ligases E3 do tipo SCF/CRL1 em diferentes organismos e contextos fisiológicos^{36,38}.

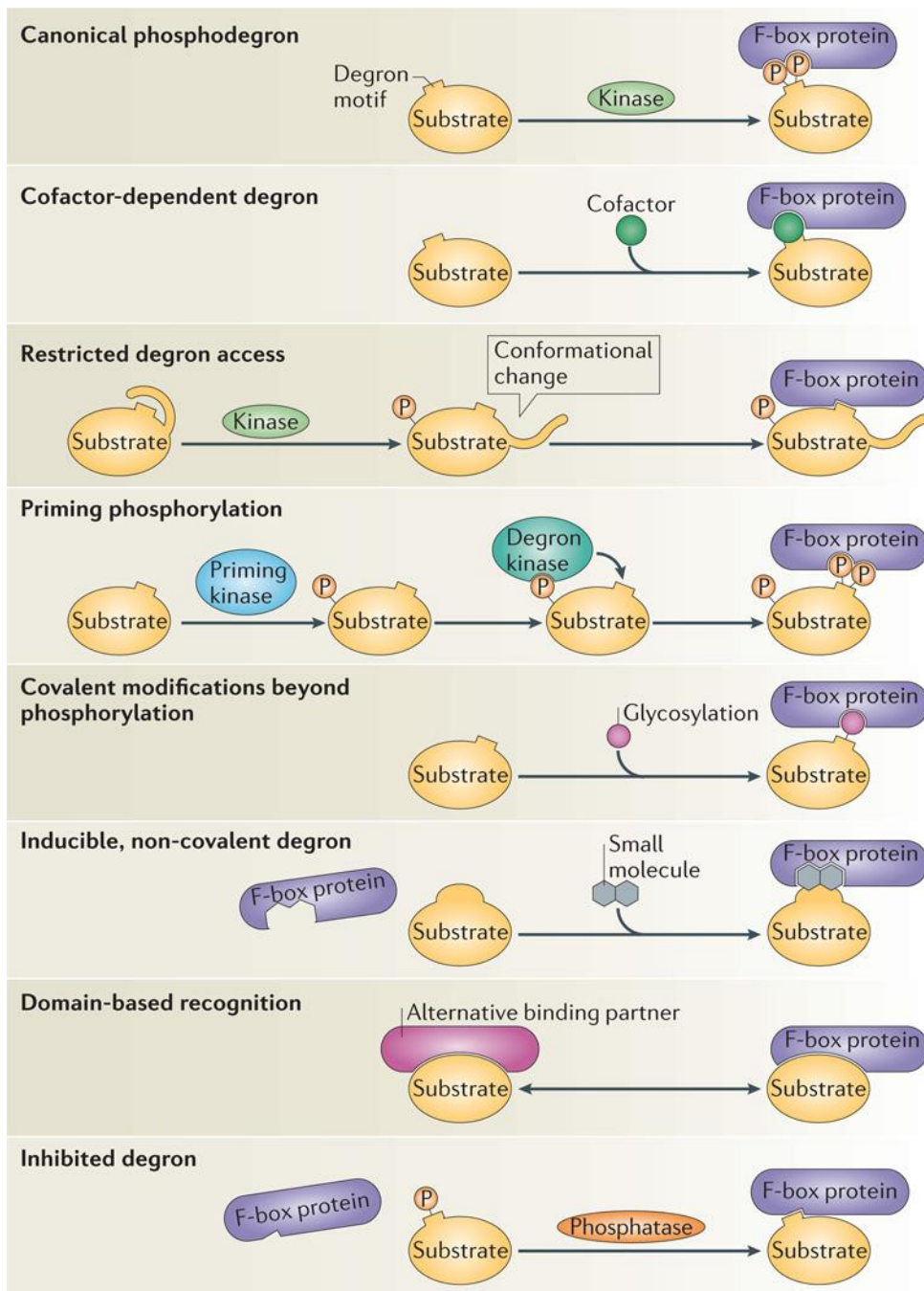


Figura 7. As proteínas *F-box-like* funcionam como adaptadores no complexo LinfCRL1, reconhecendo substratos por múltiplos mecanismos que podem atuar isoladamente ou de forma combinada, garantindo controle preciso da ubiquitinação e da estabilidade proteica. Em um mesmo substrato, podem integrar o reconhecimento de fosfodegrons dependente de fosforilações prévias e de degrons não modificados, cuja interação pode ser modulada por restrições estruturais que regulam o acesso ao sítio de reconhecimento (Fonte: Skaar, 2013)³⁸.

Nos tripanossomatídeos, o SUP apresenta componentes conservados do complexo SCF (Skp1–Cullin1–Rbx1–F-box), embora com particularidades evolutivas marcantes. Em *Trypanosoma brucei*, estudos funcionais demonstraram que os componentes centrais

do complexo SCF são essenciais para a progressão do ciclo celular, indicando que a ubiquitinação dependente de F-box exerce papel crítico na regulação temporal da degradação proteica. Análises genômicas revelaram um repertório específico de proteínas contendo domínio F-box, sugerindo que esses parasitos adaptaram o maquinário SCF às suas características singulares de regulação gênica predominantemente pós-transcricional. Além disso, abordagens experimentais recentes evidenciaram que o complexo SCF endógeno em *T. brucei* é funcionalmente competente para mediar degradação proteica direcionada, validando a atividade biológica das F-box no contexto celular do parasito³⁹.

De maneira complementar, em *Trypanosoma cruzi*, análises bioinformáticas e proteômicas identificaram múltiplas proteínas *F-box-like*, algumas apresentando organização estrutural distinta do padrão clássico descrito em outros eucariotos. A variação na posição do domínio F-box e na arquitetura modular dessas proteínas sugere diversificação funcional ao longo da evolução dos tripanossomatídeos. Esses achados indicam que o complexo SCF em *T. cruzi* pode estar envolvido em processos regulatórios associados à diferenciação, adaptação ao hospedeiro e sobrevivência em condições de estresse, reforçando a noção de que as *F-box-like* nesses organismos não são apenas estruturalmente conservadas, mas funcionalmente especializadas⁴⁰.

A integração dessas evidências com dados obtidos em *Leishmania infantum* fortalece o conceito de que os tripanossomatídeos possuem complexos do tipo CRL1/SCF ativos e biologicamente relevantes. Estudos recentes do nosso grupo empregando proteômica por espectrometria de massas para análise dos interatômas de LinfSkp1 e LinfCul1 revelaram proteínas associadas a múltiplos processos celulares. Nesse contexto, seis proteínas F-box-like (LinfFlp1–6) foram identificadas, e a interação de cada uma com LinfSkp1 foi confirmada, reforçando a presença de complexos do tipo SCF com especificidade de substrato mediada por F-box. Ensaio *in vitro* demonstraram que o complexo *LinfCRL1* associado a LinfFlp1 é capaz de transferir ubiquitina, evidenciando atividade E3 ligase funcional no parasito³⁰.

Considerando a forte dependência desses organismos de mecanismos pós-transcricionais para o controle da expressão gênica, a regulação mediada por proteínas *F-box-like* pode representar um eixo central de controle celular. Em *Leishmania*, a necessidade de remodelação proteômica rápida durante a diferenciação promastigota–amastigota sugere que módulos de reconhecimento como F-box atuem como pontos estratégicos de regulação em transições de estado celular, resposta ao estresse e

coordenação do ciclo celular. Dessa forma, a caracterização bioquímica, funcional e estrutural das *F-box-like* em *Leishmania* não apenas contribui para o entendimento da biologia básica do parasito, mas também pode revelar vulnerabilidades potencialmente exploráveis no desenvolvimento de estratégias terapêuticas seletivas⁴¹.

As limitações terapêuticas observadas no tratamento das leishmanioses, aliadas ao risco crescente de resistência, reforçam a necessidade de identificar e validar alvos moleculares essenciais do parasito^{6,10,11}. Paralelamente, as particularidades da regulação gênica em tripanossomatídeos (marcada por forte controle pós-transcricional) e a exigência de intensa remodelação proteômica durante a diferenciação entre promastigota e amastigota sustentam a relevância de mecanismos de controle proteico para a adaptação e sobrevivência do parasito^{14,16,17,42}. Nesse contexto, o Sistema Ubiquitina–Proteassoma (SUP) emerge como eixo regulatório central, capaz de integrar controle de qualidade proteica, regulação funcional e plasticidade celular.

Embora ortólogos dos genes humanos *SKP1*, *CUL1* e *RBX1* tenham sido identificados no genoma de *L. infantum*, não foram encontradas proteínas ortólogas às *F-box* de *H. sapiens* no parasito. Essa ausência sugere um grau de divergência evolutiva nos adaptadores de reconhecimento de substrato do complexo SCF no parasito, o que pode refletir mecanismos regulatórios específicos e potencialmente exploráveis do ponto de vista terapêutico. Nesse contexto, a identificação e caracterização de um complexo CRL1/SCF funcional em *L. infantum* contendo proteínas *F-box-like* (LinFflp) associadas a LinfSkp1³⁰, reforça a hipótese de que esses adaptadores desempenhem papéis centrais em processos fundamentais do parasito, como crescimento, diferenciação e adaptação ao ambiente intracelular. Caracterizamos 6 LinFflps em *L. infantum*, mas a função destas proteínas não foi investigada.

Portanto, a caracterização bioquímica e estrutural das proteínas LinFflps em *L. infantum* representa um passo estratégico para elucidar a especificidade do SUP nesse organismo. Essa abordagem pode fornecer bases moleculares para investigações funcionais, integrar a compreensão do SUP à biologia adaptativa do ciclo de vida do parasito e contribuir para a identificação de vulnerabilidades moleculares exploráveis, particularmente relevantes diante da ausência de ortólogos humanos, com impacto translacional no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra a leishmaniose visceral.

2. OBJETIVOS

2.1. – Objetivo geral

- Caracterizar bioquimicamente e funcionalmente os genes LINF_150014400 (*F-box like protein 2 – LinfFLP2*) e LINF_140018100 (*F-box like protein 3 – LinfFLP3*) em *Leishmania infantum*.

2.2. – Objetivos específicos

- Realizar o nocaute dos genes *LinfFLP2* e *LinfFLP3* por CRISPR-Cas9;
- Obter linhagens de *Leishmania infantum* expressando estavelmente as proteínas LinfFlp2 e LinfFlp3 em fusão com a tag HA no C-terminal e avaliar suas localizações intracelulares;
- Identificar as proteínas parceiras de LinfFlp2 e LinfFlp3 através de imunoprecipitação dos lisados proteicos seguida por análise através de espectrometria de massas (MS);
- Buscar dentre as proteínas parceiras identificadas por MS de cada linhagem, aquelas com funções relacionadas ao SUP com capacidade de ubiquitinação dependente de LinfFlp2 e LinfFlp3;
- Gerar linhagens nocaute de uma cópia do gene *LinfFLP3* para avaliar a morfologia, capacidade de crescimento e ciclo celular.

2.3. – Hipóteses

- Os nocautes parciais e/ou completos dos genes *LinfFLP2* e *LinfFLP3* afetam a proliferação, ciclo celular, morfologia e diferenciação do parasito de promastigotas em amastigotas;
- As proteínas LinfFlp2 e LinfFlp3 interagem com proteínas envolvidas em vias bioquímicas importantes de diferentes processos celulares que afetam a sobrevivência e adaptação do parasito.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa foi realizada no Laboratório de Bioquímica Celular – LBqC, do Departamento de Genética e Evolução – DGE/UFSCar, obedecendo todos os

Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) e as Boas Práticas Laboratoriais (BPLs) para a segurança do manipulador e confiabilidade nos resultados experimentais obtidos.

3.1. – Cultivo de promastigotas de *L. infantum*

O LBqC- Laboratório de Bioquímica Celular é certificado pelo CTNBio como NB2 (Extrato de parecer 6961/2020, D.O.I. de 10/06/2020) para trabalho com *Leishmania infantum*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, lentivírus e retrovírus recombinante e SARS-CoV-2 inativado. O isolado de *L. infantum* HU-UFS14 (Repositório Institucional da UFS) obtido de um garoto de 15 anos diagnosticado com leishmaniose visceral no Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe em 2009 foi utilizado neste projeto⁸. Este isolado foi inicialmente caracterizado em infecções experimentais em 2015 pelo Laboratório de Imunoparasitologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) e desde então tem sido utilizado em modelos de infecção *in vivo* e *in vitro* em estudos publicados em diferentes artigos. Este isolado foi descongelado em gelo e posteriormente, lavado em PBS 1x e centrifugados a $1050 \times g$ por 10 min a 4°C. O precipitado foi ressuspenso em 5 mL de M199 contendo 20% (v/v) de soro bovino fetal (SBF) inativado, antibióticos (Penicilina-Streptomicina – 1:100). Por fim, o material foi transferido para uma garrafa de cultivo e o crescimento foi realizado a 25°C de 4 a 7 dias. Os parasitos foram repicados de acordo com a confluência das garrafas sendo atingidas.

3.2. – Nocaute gênico por CRISPR-Cas9

A linhagem *LinfCas9/T7* foi produzida conforme Correia et al 2024³⁰ através da transfecção de promastigotas com o vetor de expressão episossomal pTB007 contendo os genes da nuclease Cas9 com sinalização nuclear e 3 epítopos da tag FLAG, da RNA polimerase T7 com sequência de sinalização nuclear, e o gene de resistência a higromicina, permitindo o reparo do DNA com a inserção do DNA doador e a transcrição *in vivo* do sgRNA a partir do produto de PCR dupla fita (sgDNA). A transfecção foi efetuada em tampão $1 \times$ Tb-BSF buffer (90 mM de fosfato de sódio, 5 mM de KCl, 0,15 mM de CaCl₂, 50 mM de HEPES) utilizando o eletroporador *ECM 830 (BTX Molecular Delivery Systems)* foi utilizado para as transfecções seguindo o protocolo *standard* para *Leishmania mexicana*.

Após 7 dias de transfecção foi possível verificar que as formas promastigotas transfectadas apresentaram resistência ao antibiótico e a produção da linhagem Cas9T7 foi confirmada através de PCR com *primers* específicos para o gene da nuclease Cas9,

sendo o *forward*: CATCGTGGACGAGGTGGCCT, e *reverse*: GAGGGCCACGTAGTAGGGG. Através da metodologia descrita em Beneke et al (2017)⁴³, com utilização da cepa *L. Infantum* Cas9T7, as cepas nocautes foram estabelecidas. As sequências de *primers* para amplificação por PCR dos sgDNAs (*single guide DNAs*) e os cassetes de reparo para os genes deletados foram desenhados através da ferramenta online *LeishGEdit* (<http://www.leishgedit.net/Home.html>) (**Tabela 1**) inserindo de entrada os identificadores dos genes *LinFFLP2* (LINJ_15_0740) (*Uncharacterized protein*) e *LinFFLP3* (LINJ_14_1250) (*Putative ras-like small GTPases*). Para obtenção e amplificação dos cassetes de reparo (doadores) dos genes nocauteados, os *primers* 1 e 5 representados na **Figura 8** foram utilizados juntamente com os *templates* pTblast_v1 e/ou pTPuro_v1 (<http://www.leishgedit.net/Home.html>). Este produto de PCR determina o DNA doador entregue à célula nocauteada. Para amplificação do sgDNA, utilizamos os *primers* 5' sgRNA e 3' sgRNA (**Tabela 1**) usando como *template* a sequência de gRNA (AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTA TTTT AACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC).

Os produtos derivados de PCR foram transfectados na linhagem *L. infantum* Cas9-T7 e o sgRNA produzido *in vivo* pela linhagem. Para obtenção das linhagens nocautes, 2 x 10⁷ células de *L. infantum* Cas9T7 foram transfectadas, utilizando 5 µg do produto de PCR do cassete de reparo (DNA doador) e 2 µg dos sgDNA 3' e 5' amplificados por PCR referente a cada um dos genes nocauteados. As linhagens foram deixadas em meio sem antibiótico por 24h (tempo de integração do cassete de reparo ao genoma), seguidamente o antibiótico correspondente ao gene de resistência contido no cassete de reparo foi adicionado. Adição ao meio de cultivo: higromicina 60 µg/mL; puromicina à 120 µg/mL e blasticidina à 60 µg/mL. Deste modo, as linhagens que receberam o cassete de reparo, obtiveram seus respectivos genes nocauteados e sobreviveram à exposição aos antibióticos, foram selecionadas. Como os genes de *Leishmania infantum* estão apresentados no genoma em uma cópia por cromossomo diploide, dois cassetes de reparo diferentes contendo os genes para crescimento em diferentes antibióticos foram entregues às células para obtenção do duplo nocaute, enquanto para o *single* nocaute, apenas um cassete de reparo foi utilizado. Posteriormente, o DNA das linhagens selecionadas foi extraído pelo kit QIAGEN *DNeasy Blood and Tissue Kit*. As respectivas alterações no genoma pelo sistema CRISPR-Cas9 foram avaliadas por PCR dirigidos aos respectivos *locus* dos genes propostos neste projeto de pesquisa (**Tabela 2**). Os vetores pT foram

fornechos pelo Prof. Dr. Adriano Cappellazzo Coelho (IB-Unicamp), nos quais foram transformados em células competentes DH5 α , cujas colônias crescidas foram inoculadas para crescimento e purificação do seu DNA plasmidial por *mini-prep* (Qiagen - cat. no. 27106). Além disso, o eletroporador *ECM 830 (BTX Molecular. Delivery Systems)* foi utilizado para as transfecções seguindo o protocolo *standard* para *Leishmania mexicana*.

Tabela 1. *Primers* utilizados para nocaute dos genes alvos, disponíveis no sítio: <http://www.leishgedit.net/Home.html>.

<i>Primers</i>	<i>Sequência (5' - 3')</i>
FLP2- <i>barcode</i> -UFP	ATGGAGACACGGGCGCAGGAACGCACAGCCgtgtatcggatgtcagttgcCGGGTGTGGG ACCTTTgtataatgcagacctgtgc
FLP2-DRP	ATACACGTGCAGAGCAACGCGACACAGAGTccaattgagagacctgtgc
FLP2-3sgRNA	gaaattaatagactcactataggCCCCCTCCCGAACTTGATGAgtttagagctagaaatagc
FLP2-5sgRNA	gaaattaatagactcactataggCTCGGGAGAAGTATTGTGGAgttttagagctagaaatagc
FLP3- <i>barcode</i> -UFP	TCTGCGGCTGCGTCCGCCTCTCGGCGGGCAgtgtatcggatgtcagttgcTCGATGCCCGTAT CACCgtataatgcagacctgtgc
FLP3-DRP	CGCAACACGCTCTTGTCGAGGAGCGCATTCccaattgagagacctgtgc
FLP3-3sgRNA	gaaattaatagactcactataggTTTACATCTGCAGCACCCAAgttttagagctagaaatagccagacctgtgc
FLP3-5sgRNA	gaaattaatagactcactataggATCGGCGACAACGAGCCATCgttttagagctagaaatagc

Tabela 2. *Primers* utilizados para validação de alterações genômicas induzidas pelo sistema CRISPR-Cas9 nos respectivos *loci* gênicos.

<i>Primers</i>	<i>Sequência</i>
FLP2-UFP	ATGGAGACACGGGCGCAGGAACGCACAGCCGTATAATGCAGACCTGCTGC
FLP2-URP	AGGCAGAGAATTCCCGTCTTTGCCGTTTCATACTACCCGATCCTGATCCAG
FLP3-UFP	TCTGCGGCTGCGTCCGCCTCTCGGCGGGCAGTATAATGCAGACCTGCTGC
FLP3-URP	GGAGGATTGCACCGCACCACTGCCGCTCATACTACCCGATCCTGATCCAG
BLAST F	ATGCCTTTGTCTCAAGAAGAATCCA
BLAST R	GCCCTCCACACATAACCAG
PURO F	ATGACTGAATACAAGCCAACGGTTC
162-R	CCAATTTGAGAGACCTGTGC

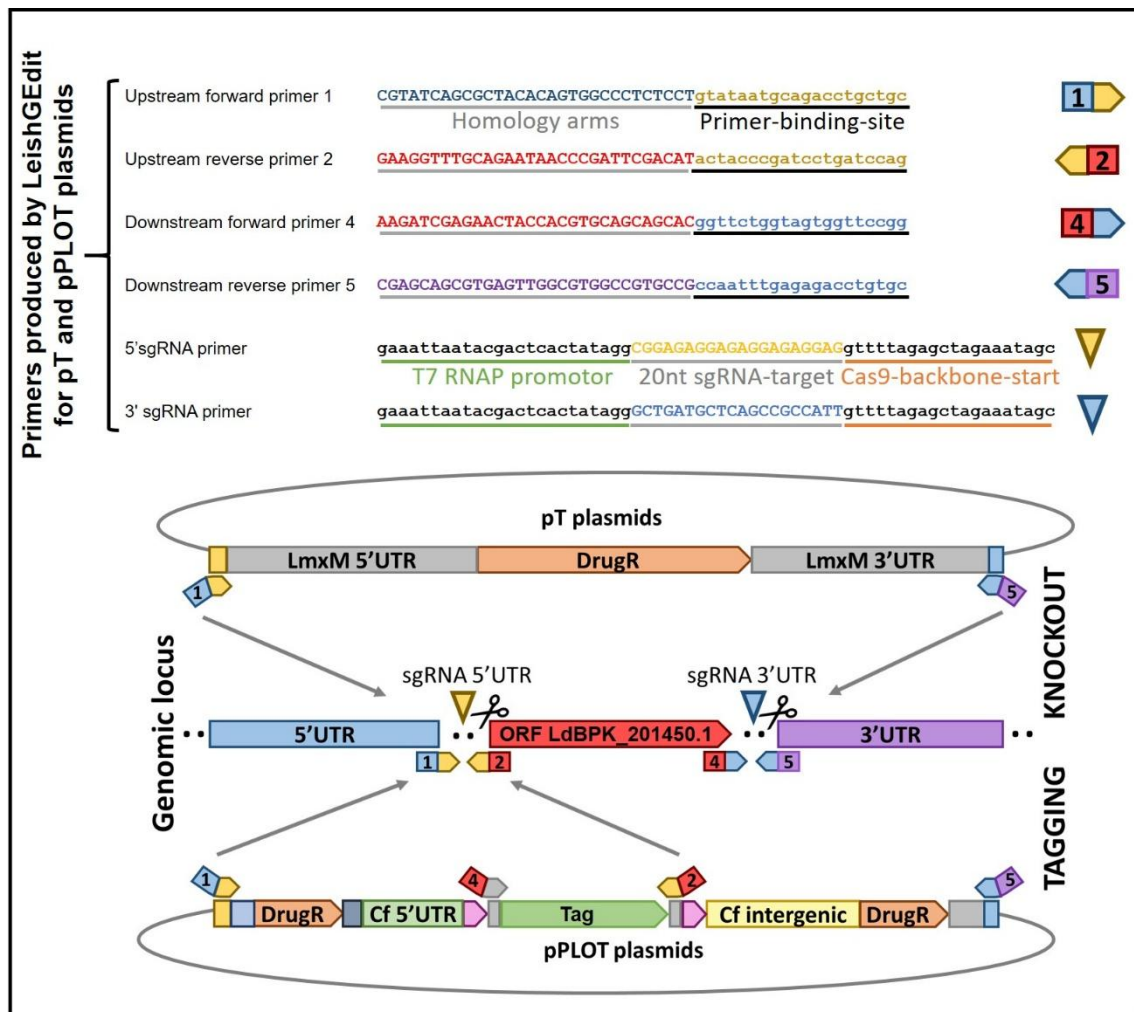


Figura 8. Imagem adaptada do site <http://www.leishgedit.net/Home.html> indicando os primers e vetores utilizados para a inserção do cassete de reparo no *locus* dos genes alvo⁴³.

3.3. – Curva de crescimento de promastigotas

As seguintes linhagens foram geradas e utilizadas neste trabalho:

- *L. infantum* Cas9T7; *LinfFLP2* duplo nocaute (DKO); *LinfFLP2-HA*; *LinfFLP3* duplo nocaute (DKO) (não viável); *LinfFLP3* single nocaute (SKO); *LinfFLP3-HA* com duplo nocaute genômico de *LinfFLP3*.

As linhagens foram plaqueadas em triplicata em placas de 12 poços contendo 2×10^5 cells/mL em 2 mL de meio M199 completo (20% SBF, 1% Penicilina-Estreptomicina). Para todas as linhagens foram adicionados ao meio de cultivo seus respectivos antibióticos de seleção. A contagem de promastigotas foi realizada através da diluição 1:100 das amostras em PBS 1X + formaldeído 2%, onde 10 μ L dessa mistura foi colocada na câmara de Neubauer para a contagem dos cinco quadrantes da diagonal localizados no quadrante central. O número total de células foi obtido através da fórmula:

$$(Q1+Q2+Q3+Q4+Q5) \times 5 \times 10^2 \times 10^4)$$

As placas foram mantidas em estufas a 27°C em atmosfera de 5% de CO₂. A contagem celular foi realizada a cada 24h durante 8 dias consecutivos. A geração do gráfico e análise dos valores obtidos foram produzidos através do teste estatístico *two-way* ANOVA pelo programa GraphPad Prism v5.0.

3.4. – Marcação de DNA para análise por citometria de fluxo

Para a análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo, as células foram inicialmente coletadas por centrifugação a $1.600 \times g$ por 3 minutos, utilizando tubos tipo Falcon de 15 mL. Para culturas com densidade celular entre aproximadamente 2×10^6 e 7×10^6 células/mL, um volume de 3 mL foi considerado suficiente para cada amostra. Após a centrifugação, o pellet celular foi imediatamente ressuspensionado em 1,5 mL de PBS 1X suplementado com 5 mM de EDTA. As amostras foram então homogeneizadas até completa dispersão dos agregados celulares, garantindo uma suspensão uniforme. Em seguida, foram adicionados lentamente 7 mL de metanol absoluto à suspensão celular, sob agitação contínua, promovendo a fixação das células. Após a adição do metanol, as amostras foram novamente homogeneizadas. A partir desta etapa, as amostras fixadas puderam ser manipuladas fora de condições estéreis. Para a etapa de marcação, as amostras fixadas foram previamente homogeneizadas e uma alíquota de 5 mL foi retirada para processamento, mantendo-se o restante como reserva. As células foram então centrifugadas a $1.600 \times g$ por 3 minutos e o sobrenadante cuidadosamente descartado por inversão do tubo. O *pellet* celular foi ressuspensionado em 1 mL de PBS 1X suplementado com 5 mM de EDTA, contendo 10 µg/mL de iodeto de propídio (Propidium Iodide, PI) e 10 µg/mL de RNase A. As amostras foram novamente homogeneizadas. Em seguida, os tubos foram protegidos da luz com papel alumínio e incubados a 37 °C por um período de 15 a 30 minutos, permitindo a degradação do RNA e a adequada incorporação do corante ao DNA. As amostras foram mantidas protegidas da luz até o momento da aquisição dos dados, que foi realizada em citômetro de fluxo CytoFlex (Beackman) para análise do conteúdo de DNA e distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular.

3.5. – *Imunofluorescência em células de Leishmania*

Para os ensaios de imunofluorescência, lamínulas de vidro foram previamente preparadas por tratamento com poli-L-lisina, visando favorecer a adesão celular. As lamínulas foram incubadas com a solução por um período de 15 a 30 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, secas ao ar em condições estéreis. Para a preparação das amostras, foram utilizadas 1×10^6 células por lamínula. As células foram inicialmente coletadas por centrifugação a $1600 \times g$ por 10 minutos e lavadas duas vezes com 500 μL de PBS 1X, a fim de remover resíduos do meio de cultura. Em seguida, o pellet celular foi ressuscitado em 500 μL de solução de paraformaldeído a 2% em PBS 1X, mantendo-se uma densidade celular aproximada de 5×10^4 células/ μL , e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente sob agitação em rotador, garantindo uma fixação homogênea. Após a fixação, as células foram novamente centrifugadas a $1600 \times g$ por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuscitado em 500 μL de PBS 1X. Para a etapa de adesão, 30 μL da suspensão de células fixadas foram cuidadosamente depositados sobre cada poço da lâmina de 12 wells (Perfecta) e incubados por 30 minutos à temperatura ambiente, permitindo a fixação das células à superfície. Após esse período, o excesso de líquido foi removido cuidadosamente, evitando o deslocamento das células aderidas. A permeabilização celular foi realizada pela adição de uma gota de solução de 0,5% de Triton X-100 em PBS, em 30 μL para apenas cobrir o poço, com incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram lavadas uma vez com 30 μL de PBS 1X. Para a imunomarcção, foi realizada inicialmente uma etapa de bloqueio com 30 μL de solução de BSA a 3% em PBS contendo 0,3% de Triton X-100, por um período de 30 minutos a 1 hora à temperatura ambiente. Após a remoção da solução de bloqueio, o anticorpo primário (anti-HA #3724, Cell Signaling), previamente diluídos em BSA 3% em PBS 1X contendo 0,3% de Triton X-100, foram adicionados às amostras, respeitando-se as diluições recomendadas pelos fabricantes, e incubados *overnight* a 4 °C. Após a incubação com o anticorpo primário, as células foram lavadas três vezes com 30 μL de PBS 1X, a fim de remover anticorpos não ligados. Em seguida, procedeu-se à incubação com anticorpos secundários (Alexa Fluor Goat anti-rabbit 488-Thermo, na diluição de 1:800), diluídos em BSA 3% em PBS contendo 0,3% de Triton X-100, por 30 minutos à temperatura ambiente. A partir dessa etapa, todos os procedimentos foram realizados protegidos da luz para evitar fotodegradação dos fluoróforos. Após a incubação com os anticorpos secundários, as células foram lavadas três vezes com PBS 1X, com duração de 5 minutos cada lavagem, mantendo-se sempre

protegidas da luz. Por fim, as lamínulas foram montadas em lâminas de microscopia utilizando meio de montagem contendo DAPI (Fluoro Mount-G™ Mounting Medium, with DAPI, Thermo), para marcação do DNA nuclear e cinetoplastidial. As lâminas foram então armazenadas no escuro até a completa secagem do meio de montagem e posterior análise em microscópio confocal LSM 980 Airyscan 2 (Zeiss) no Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) da UFSCar.

3.6. – Subclonagem dos genes *LinFLP2* e *LinFLP3* com tag HA no C-terminal no vetor pLEXSY-neo2

Para a clonagem dos genes *LinFLP2* e *LinFLP3*, os insertos foram amplificados por PCR a partir de *templates* contendo estes genes clonados no vetor pcDNA3.1(+)-C-HA, utilizando *primers* contendo sítios de restrição das enzimas *NotI* e *NcoI* (Thermo Fisher) e a sequência da tag HA (Tabela 3). As reações de PCR foram realizadas com a enzima Fast Polymerase (FastPol HF DNA Polimerase #POL-132XL, Cellco), segundo informações do fabricante e detalhadas na Tabela 4. A ciclagem foi realizada conforme Tabela 5.

Tabela 3. Sequência dos primers para clonagem dos genes *LinFLP2* e *LinFLP3* com a tag HA (C-terminal) no vetor pLEXSYneo2. Os nucleotídeos grifados em verde e vermelho representam o *start e stop códon*, respectivamente e em letra minúscula representam o sítio de restrição.

Primers	Sequência	Tm
<i>HA Reverse NotI</i>	ATTAgcggccgc TTA GCGTAATCTGGT	68 °C
<i>FLP2-NcoI Forward</i>	CTATccatgg ATG AACGGCAAAGACGG	63 °C
<i>FLP3-NcoI Forward</i>	ATATCAccatgg ATG AGCGGCAGTGG	64 °C

Tabela 4. Reação de PCR para amplificação dos genes *LinFLP2* e *LinFLP3*.

Componentes	Quantidade e volume
H ₂ O	30,5 µL
<i>Buffer</i> (10X)	10 µL
dNTP	5 µL
<i>Primer forward</i>	1,5 µL
<i>Primer reverse</i>	1,5 µL
<i>Fast polymerase</i> (cellco)	0,5 µL
<i>DNA template</i> (100 ng/uL)	1 µL
Volume total	50 µL

Tabela 5. Ciclagem de PCR para amplificação dos genes *LinfFLP2* e *LinfFLP3*.

Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
95	1 min	1
95	30 s	35X
60	1,45 min	
72	20 s	
72	7 min	1
4	∞	1

Após a reação de PCR, os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% e visualizados utilizando SYBR Safe (Thermo Scientific). As bandas correspondentes foram cuidadosamente excisadas com o auxílio de um transiluminador e, em seguida, purificadas utilizando o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, cat. no. 28704), seguindo o protocolo do fabricante. Os fragmentos purificados e o vetor de expressão pLEXSYneo2 foram digeridos com as enzimas *NotI/NcoI* conforme as instruções do fabricante e descritas na **Tabela 6** a 37°C por 3 horas, seguida de inativação enzimática a 80°C por 20 minutos.

Tabela 6. Reação de digestão dos genes *LinfFLP2* e *LinfFLP3* e do vetor pLEXSYneo2.

<i>pLEXSYneo2</i> (<i>NotI/NcoI</i>)		<i>LinfFLP2/LinfFLP3</i> (<i>NotI/NcoI</i>)	
Componentes	Volume	Componente	Volume
Plasmídeo (1µg)	2 µL	Inserto purificado	30 µL
<i>NotI</i>	1 µL	<i>NotI</i>	1 µL
<i>NcoI</i>	1 µL	<i>NcoI</i>	1 µL
Buffer (2X)	2 µL	Buffer (2X)	5 µL
H2O	14 µL	H2O	13 µL
Volume final	20 µL	Volume final	20 µL

Os produtos das digestões enzimáticas dos vetores foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% e posteriormente purificados. Os insertos foram então ligados aos respectivos vetores previamente digeridos, utilizando a enzima T4 DNA ligase, em tampão fornecido pelo fabricante (Thermo Scientific, cat. 15224041). A reação de ligação de 20µL foi realizada a 22 °C por 1 hora, utilizando os volumes e concentrações para as proporções 1:1 e 3:1 conforme [NEBioCalculator](#). Após a incubação, a enzima foi inativada a 70 °C por 5 minutos. Todo o DNA plasmidial obtido

foi então introduzido em células competentes DH5 α por meio de transformação via choque térmico. A mistura foi mantida em gelo por 30 minutos, seguida de um choque térmico a 42°C por 1 minuto, e imediatamente incubada novamente no gelo por 5 minutos. Após esse processo, foram adicionados 800 μ L de meio LB líquido, e as células foram incubadas a 37°C e 200 rpm por 1 hora. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 2.150 \times g por 5 minutos, parte do sobrenadante foi descartada, e o *pellet* celular foi ressuspensionado no volume restante do meio. As células transformadas foram então plaqueadas em meio LB-ágar contendo ampicilina, garantindo a seleção dos clones portadores do vetor, uma vez que este contém um gene de resistência ao antibiótico ampicilina. As colônias obtidas foram inoculadas e incubadas a 37°C e 200 rpm por 12 horas para crescimento. O DNA plasmidial foi extraído utilizando o protocolo do QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Cat. No. 27104). Para confirmar a clonagem, o DNA purificado foi digerido com as enzimas *NotI/NcoI*. Os produtos digeridos foram separados em gel de agarose 0,8% para verificação de liberação dos insertos. Após a confirmação por digestão os plasmídeos foram sequenciados no Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco, no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB - USP). Após confirmação das sequências, procedeu-se à digestão *overnight* com a enzima *SwaI* (Thermo Fisher), visando a linearização do vetor e a excisão da região bacteriana (**Figura 8**). Uma pequena fração do material digerido foi analisada em gel de agarose 0,8% para confirmação do processo, e o restante foi purificado para posterior utilização na transfecção por eletroporação das *L. infantum*. O processo de eletroporação foi o mesmo descrito anteriormente na seção 4.2., mas utilizou-se após 24 hrs de transfecção o antibiótico G418 (análogo a neomicina) à 300 μ g/mL para seleção. O plasmídeo pLEXSY-Neo2 digerido integra-se de forma constitutiva por meio de recombinação homóloga após o promotor ribossomal 18S (**Figura 9**).

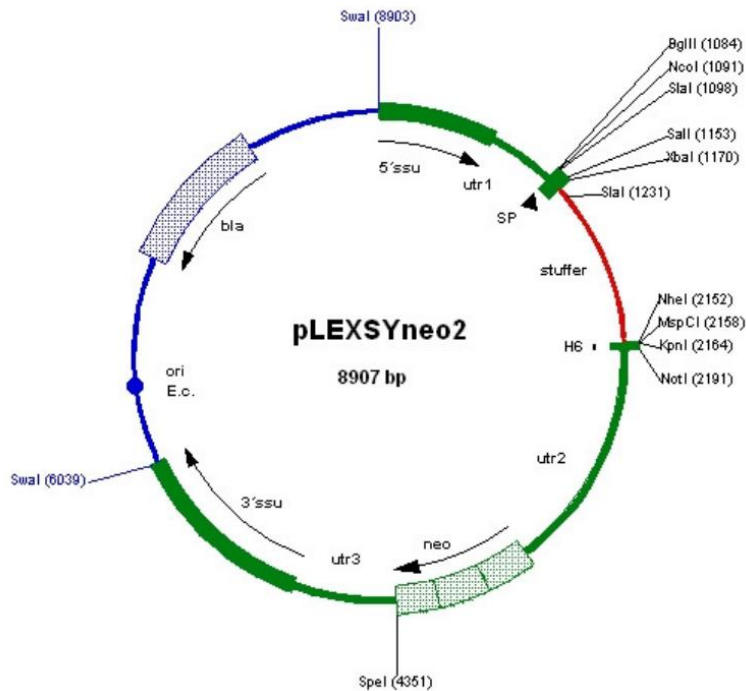


Figura 9. Mapa do vetor de expressão pLEXYneo2 (Cat. No. EGE-233) com sítios de clonagem para os genes-alvo, substituindo o fragmento stuffer de 1 kb. As regiões 5'ssu e 3'ssu são responsáveis pela recombinação homóloga no cromossomo hospedeiro após a linearização do plasmídeo de expressão com *SwaI*. Esquema retirado do www.jenabioscience.com.

3.7. – Purificação das proteínas parceiras de LinfFlp2-HA e LinfFlp3-HA nas linhagens de L. infantum por imunoprecipitação

Os procedimentos foram realizados para cada uma das 2 linhagens de *L. infantum* geradas neste trabalho em comparação a linhagem controle Cas9T7. Para cada uma das 3 replicatas independentes cerca de 4×10^9 promastigotas foram lavadas duas vezes com PBS1x e foram lisadas em 500 μ L de tampão gelado (50 mM Tris-HCl pH 7.2, 225 mM KCl, e 1% NP-40) suplementado com o coquetel de inibidores de protease SIGMAFAST (Sigma-Aldrich) e inibidores de fosfatase (10 mM de NaF e 1 mM de Na_3VO_4) (Sigma-Aldrich) com três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento à temperatura ambiente. Posteriormente, os lisados foram mantidos em gelo por 30 minutos e depois centrifugados por 20 minutos a $14.000 \times g$ a 4 °C. A concentração de proteínas foi determinada por reagente de Bradford (*Sigma Aldrich*). Lisados equivalentes a 28 mg (Cas9T7), ou 11 e 5 mg de proteínas para LinfFlp2 e LinfFlp3, respectivamente, foram incubados com 50 μ L de *beads* contendo anticorpo anti-myc imobilizado (Ezview anti-myc- SigmaAldrich) por 3h/ 4°C em rotação. As *beads* foram lavadas 5x com tampão de lise gelado e 5x com tampão de lise gelado sem NP40. Após as lavagens, as proteínas

ligadas nas *beads* foram eluídas com 40 µl de cloreto de guanidino 6M por 10 minutos em TA.

3.8. – Preparação das amostras para análise por espectrometria de massas

As frações eluídas foram diluídas em bicarbonato de amônio 50 mM para reduzir a concentração do cloreto de guanidino para 1M. Em seguida, a redução das proteínas foi realizada com a adição de ditioneitol (DTT) 0,5M para concentração final de 10 mM e as amostras incubadas a 56°C por 20 minutos. Para alquilação dos grupos tióis, adicionou-se iodoacetamida 0,55 M fresco para concentração final de 20 mM, e as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos, protegidas da luz. Depois, 2 µg de tripsina *gold* (Promega V5280) diluída em bicarbonato de amônio 50 mM foi adicionado, e as amostras foram misturadas e incubadas durante a noite a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 2 µL de ácido trifluoroacético fumegante e incubada por 5 min a temperatura ambiente e o pH ácido foi confirmado em fita indicadora. A partir deste ponto, as amostras foram processadas no Laboratório Nacional de Biociências em Campinas no Laboratório MAS, em proposta multiusuária aprovada (MAS 25791). Estas amostras foram processadas para dessalinização usando *Stage Tips* com membranas C18 (discos de extração Octadecil C18-sílica ligada – 3M Empore) e completamente secas em um evaporador (SPD 1010 SpeedVac, Thermo)⁴⁴.

3.9. – Análise por Nanoflow nLC-MS/MS

As amostras foram reconstituídas em 10 µL de ácido fórmico, e um alíquota de 1 µL foi analisada utilizando um espectrômetro de massas Orbitrap Velos com capacidade ETD (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) acoplado a um sistema EASY-nLC (Proxeon Biosystem, West Palm Beach, FL, EUA) por meio de uma fonte de íons nanoelectrospray Proxeon. Os peptídeos foram separados utilizando uma coluna analítica PicoFrit (20 cm × ID75 µm, tamanho de partícula de 5 µm, New Objective), empregando um gradiente de 2–90% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico a uma taxa de fluxo de 300 nL·min⁻¹ por um período de 65 minutos. A voltagem do nanoelectrospray foi ajustada para 2,2 kV, e a temperatura da fonte foi mantida a 275 °C. Os métodos do instrumento foram configurados em modo de aquisição dependente de dados. Espectros MS de varredura completa (m/z 300–1600) foram adquiridos utilizando o analisador Orbitrap após acumulação até um valor-alvo de 1 × 10⁶. A resolução no Orbitrap foi definida como $r = 60.000$, e os 20 íons de peptídeos mais intensos com estados de carga ≥ 2 foram

isolados sequencialmente até um valor-alvo de 5.000 e fragmentados na armadilha de íons linear usando CID de baixa energia (energia de colisão normalizada de 35%). O limite de sinal para acionar um evento de MS/MS foi estabelecido em 1.000 contagens. A exclusão dinâmica foi ativada com um tamanho de lista de exclusão de 500, uma duração de exclusão de 60 s e uma contagem de repetição de 1. Uma ativação de $q = 0,25$ e um tempo de ativação de 10 ms foram aplicados⁴⁵.

3.10. – Análise de dados brutos de LC-MS/MS

A identificação de proteínas foi realizada utilizando o *Fragpipe* com identificação de peptídeos por MSFragger⁴⁶. A análise foi conduzida utilizando o banco de dados de proteínas de *Leishmania infantum* (versão 2025; 8272 sequências; 5.263.968 resíduos) obtido do UniprotDB. A carbamidometilação foi designada como uma modificação fixa, enquanto a oxidação de metionina foi considerada uma modificação variável. Os parâmetros para identificação de proteínas incluíram um máximo de duas clivagens perdidas da tripsina e níveis de tolerância de 10 ppm para a massa do precursor e 1 Da para íons fragmentados. Um critério de filtragem foi aplicado para manter uma taxa máxima de descoberta falsa de 1% tanto em nível de peptídeos quanto de proteínas. As proteínas identificadas foram consideradas hits se apresentassem \log_2FC (*Fold Change* = média intensidade amostra/média intensidade controle negativo) maior ou igual a 2 com relação aos valores de intensidade dos controles negativos. Os alvos identificados foram analisados por enriquecimento funcional utilizando DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>), STRING (<https://string-db.org>) e REACTOME (<https://reactome.org>) visando a identificação das vias intracelulares predominantes.

3.11. – Clonagem das proteínas parceiras selecionadas com tag myc

Os genes selecionados tiveram como critérios: essencialidade em *L. mexicana* (LeishGEM), presença como *hits* nos interactomas, funções biológicas e vias associadas, além da análise estrutural no AlphaFold Server em conjunto com o complexo SCF/CRL1 com LinfFlp2 ou LinfFlp3. Dessa forma, foram escolhidos os genes: *Putative mitochondrial carrier protein* (LINF_020012000) e *Replication protein A subunit* (LINF_280024500), encontrados apenas no interactoma da LinfFlp2; *Leucine-rich repeat protein – putative* (LINF_340011100) e *Poly(A)-binding protein 3* (LINF_250005800) identificados exclusivamente no interactoma da LinfFlp3; e, *RNA-binding protein 29* –

putative (LINF_180007200) e *WD domain – G-beta repeat – putative* (LINF_080009200), identificados em ambos interactomas.

Os insertos de cada gene e o vetor pcDNA3.1(+)-N-myc foram amplificados por PCR utilizando *primers* com regiões de homologia de 30 pb (**Tabela 7**). Os fragmentos de DNA previamente purificados foram combinados ao vetor linearizado na proporção molar inserto:vetor de 3:1, totalizando 5 µL de DNA. Em seguida, adicionaram-se 5 µL de NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB), perfazendo um volume final de 10 µL por reação. A mistura foi homogeneizada suavemente e incubada a 50 °C por 60 minutos para permitir a montagem dos fragmentos. Após a reação, o DNA recombinante foi introduzido em células competentes de *Escherichia coli* β por eletroporação (2.500 V, 25 µF e 200 Ω). As células foram imediatamente recuperadas em meio SOC sob incubação adequada e, posteriormente, plaqueadas em meio LB-água suplementado com ampicilina (100 µg/mL) para seleção dos transformantes. Cinco colônias por construção foram submetidas a PCR de colônia, e as positivas foram confirmadas por sequenciamento Sanger.

Tabela 7. Sequência dos *primers* utilizados para clonagem dos genes alvos e linearização do vetor.

<i>Primers</i>	<i>Sequência</i>
MitCarProt-F	GCTGATCTCAGAGGAGGACCTGTCCGCCAAGACGGCCGC
MitCarProt-R	GAATTCGGATCCGGTACCAAGCTTTCAACGCTTCTTGGAGT CGTTCATC
LRR-F	CAGAAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGGCGGACCCTGCGCACAC
LRR-R	GACGAATTCGGATCCGGTACCAAGCTTTTACGGAAAGGCGTGTGCCTCC
PoliABind3-F	CAGAAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGGTGGTCCCAGTGCAACGCAC
PoliABind3-R	CGAATTCGGATCCGGTACCAAGCTTCTAGTTGCCAGTGTGCTGCTGAAG
RepA-F	GAAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGATGCAGCAGCCGGGCAGCC
RepA-R	GACGAATTCGGATCCGGTACCAAGCTTTCAGACGTAAGCCTCGATGAGGC
RNA-BP-29-F	GAAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGTCAGGCACGCCCATGC
RNA-BP-29-R	GAATTCGGATCCGGTACCAAGCTTTTACTTGGACGATTCTTTTTTCGACCTC
WD-dom-F	GAAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGAGCAAGTACGTGGCCCCC
WD-dom-R	GAATTCGGATCCGGTACCAAGCTTCTAGGCGTCCGTGTCGTAATTCTC
BB-pcDNA-N- F	AAGCTTGGTACCGGATCCGAATTC
BB-pcDNA-N- myc-R	AGCGTAATCTGGTACGTCGTATGGG

3.12. – Co-imunoprecipitação de células HEK293T transfetadas

Para avaliar se as interações de LinfFlp2 e LinfFlp3 de *L. infantum* observadas nos resultados obtidos nos interactomas, foram realizados ensaios de co-imunoprecipitação em células HEK293T co-transfетadas com plasmídeos codificando os genes estudados, testando a interação entre as LinfFlps com as proteínas parceiras escolhidas previamente. As transfeções foram realizadas utilizando o reagente polietileneimine (Polysciences) 1mg/mL pH 7,2 na proporção 5:1 com relação ao DNA. Para cada placa de 100 mm de células HEK293T confluentes, foram utilizando 7,5 µg de plasmídeo de Linf e 7,5 µg de plasmídeo do potencial ligante. Para todos os ensaios de co-imunoprecipitação, as células foram lisadas com tampão de lise NP-40 (50 mM Tris-HCl pH 7,2; 225 mM KCl; 1% NP-40), suplementado com coquetel inibidor de proteases SIGMAFAST (Sigma Aldrich) e inibidores de fosfatase (10 mM NaF e 1 mM Na₃VO₄) (Sigma Aldrich). Os lisados celulares foram centrifugados a 16.900 × g por 20 min a 4 °C, e aproximadamente 5 mg de proteína do sobrenadante foram submetidos à imunoprecipitação (IP) com *beads* de agarose anti-myc por 3h a 4 °C. Após a incubação, as *beads* foram submetidas a sete lavagens com tampão de lise gelado contendo NP-40, a fim de remover interações inespecíficas. A eluição das proteínas foi realizada mediante adição direta de 30 µL de tampão de Laemmli 2× às *beads*, seguida de incubação em água fervente por 5 minutos para desnaturação e liberação das proteínas ligadas. Em seguida, o sobrenadante foi cuidadosamente recuperado utilizando seringa de insulina. As frações eluídas e os *inputs* (100 µg do lisado celular total) foram resolvidos por SDS-PAGE e submetidos a *western blot*, com incubação dos anticorpos primários *overnight* a 4°C. Foram utilizados os seguintes anticorpos primários da Cell Signaling Technology em diluição 1:1000 em BSA 0,05% (v/v) e azida 0,02% (v/v) TBST: anti-HA (#3724), anti-β-actina (#3700) e anti-myc (#2272). Como anticorpos secundários, foram empregados anti-camundongo (#0741806) ou anti-coelho (#0741516) conjugados à peroxidase de rábano (HRP), ambos da KPL, por 1h à temperatura ambiente. As imagens de *western blot* foram capturadas utilizando o sistema ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. – Expressão dos genes *LinfFLP2-HA* e *LinfFLP3-HA* em *L. infantum*

Os genes *LinfFLP2* e *LinfFLP3* com a *tag* HA (C-terminal) foram amplificados dos *templates* pcDNA3.1(+)-LinfFlp2-HA e pcDNA3.1(+)-LinfFlp3-HA previamente

descritos (Correia et al., 2024). Após a purificação, os insertos foram digeridos com as enzimas *NotI/NcoI* e ligados em vetor pLEXSY-Neo2 também digerido com as mesmas enzimas. Observamos que quando utilizadas individualmente, as enzimas de restrição foram capazes de linearizar o vetor de expressão, mas quando utilizadas em conjunto, promoveram a remoção do fragmento *stuffer*, possibilitando a realização da reação de ligação com os insertos (**Figura 10A**). A clonagem foi confirmada por digestão dos DNA plasmidiais purificados de diferentes colônias selecionadas com as mesmas enzimas e a liberação dos insertos nos tamanhos esperados de ~3.2 kb para *LinfFLP2-HA* (colônia 2-C2) e ~2.9 kb para *LinfFLP3-HA* (colônias 1 e 2 - C1 e C2) (**Figura 10B**). Os DNAs plasmidiais destas colônias confirmadas foram sequenciados e confirmaram as sequencias clonadas nos vetores (**Anexo 1**). Para transfecção em *L. infantum*, os plasmídeos purificados foram digeridos com a enzima *SwaI* (Thermo Scientific) para a linearização do plasmídeo e liberação de um fragmento de 2,9 kb, correspondente à região de replicação em *Escherichia coli* (**Figura 10C**), seguido de purificação e transfecção por eletroporação, permitindo sua entrada e integração por homologia no promotor 18S do genoma de *L. infantum* Cas9/T7RNAp



Figura 10. Clonagem dos genes de *LinfFLP2* e *LinfFLP3* com tag HA no pLEXSYneo2 e transfecção em *L. infantum*. A) Digestão do vetor pLEXSYneo2 pelas enzimas de restrição *NcoI* e *NotI* para clonagem da *LinfFLP2-HA* e *LinfFLP3-HA*. B) O DNA plasmidial de cada clone foi digerido *NotI* e *NcoI* para confirmação das clonagens. C) Linearização do DNA plasmidial dos clones com *SwaI*, os quais foram confirmados anteriormente por digestão e sequenciamento, para transfecção por eletroporação em linhagens *L. infantum* Cas9/T7RNAp.

Os extratos totais das linhagens *LinfFLP2-HA* e *LinfFLP3-HA* foram resolvidos em SDS-PAGE e submetidos a *western blotting* para avaliar a expressão dos genes em fusão com HA (**Figura 11A**). Foram observadas bandas de aproximadamente 125 kDa e 85 kDa nos extratos de *LinfFLP2-HA* e *LinfFLP3-HA*, respectivamente, correspondendo a expressão dos genes em fusão com o HA no tamanho esperado. Observamos também uma banda na região de 100 kDa nas três amostras, incluindo o controle negativo. Esta marcação pode ser alguma proteína do parasito que é reconhecida inespecificamente pelo anticorpo anti-HA ou secundário utilizados (**Figura 11A**). O eluato da imunoprecipitação dos extratos com anti-HA revelou uma banda de ~125 kDa correspondente a LinfFlp2, embora bandas menos intensas em tamanhos menores tenham sido detectadas, possivelmente representando produtos de degradação proteica (**Figura 11B**). No eluato de LinfFlp3, observou-se a banda esperada de ~80 kDa, que apresentou menor intensidade em comparação com outras bandas detectadas, sugerindo extensa degradação durante o processo de purificação. (**Figura 11B**).

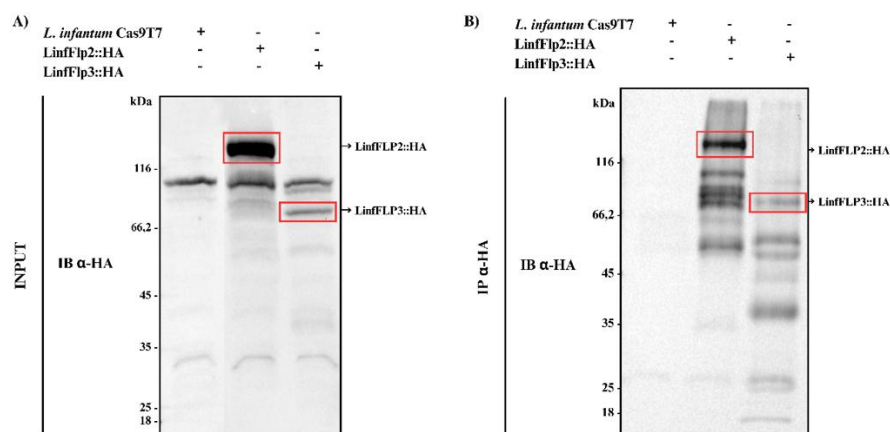


Figura 11. Avaliação das linhagens *LinfFLP2-HA* e *LinfFLP3-HA*. **A)** As linhagens foram lisadas para a obtenção dos extratos totais (*input*) de *L. infantum* Cas9T7, *LinfFLP2-HA* e *LinfFLP3-HA*, o quais foram resolvidos em SDS-PAGE 10% e revelados com anticorpo anti-HA. **B)** Frações eluídas da IP anti-HA de *L. infantum* Cas9T7, LinfFlp2-HA e LinfFlp3-HA foram resolvidos em SDS-PAGE 10% e revelados com anticorpo anti-HA.

4.2. – Identificação de ligantes de LinfFlp2-HA e LinfFlp3-HA

Aumentamos a escala de crescimento destas linhagens e realizamos o mesmo protocolo de imunoprecipitação para obtermos as frações eluídas em triplicata de cada grupo para identificação dos ligantes por espectrometria de massas para identificação dos ligantes das proteínas LinfFlp2 e LinfFlp3. A proteína LinfFlp2 foi identificada como o

maior valor de $\log_2(\text{FC})$ em seu interactoma, enquanto a LinfFlp3 ficou com valor abaixo somente da *hypothetical protein – conserved (LINF_310016300)*, indicando que o procedimento de imunoprecipitação foi conduzido como esperado, dando confiabilidade nos resultados obtidos. Foram identificadas 44 e 125 proteínas ligantes exclusivas de LinfFlp2 e LinfFlp3, respectivamente, além de 106 proteínas ligantes compartilhadas entre ambas (**Figura 12**) (**Tabela 8**). As proteínas foram agrupadas funcionalmente de acordo com informações dos bancos de dados Reactome, DAVID e STRING levando a identificação de diferentes grupos funcionais nos interactomas da LinfFlp2 (**Figura 13**), LinfFlp3 (**Figura 14**) e de ambas as proteínas (**Figura 15**).

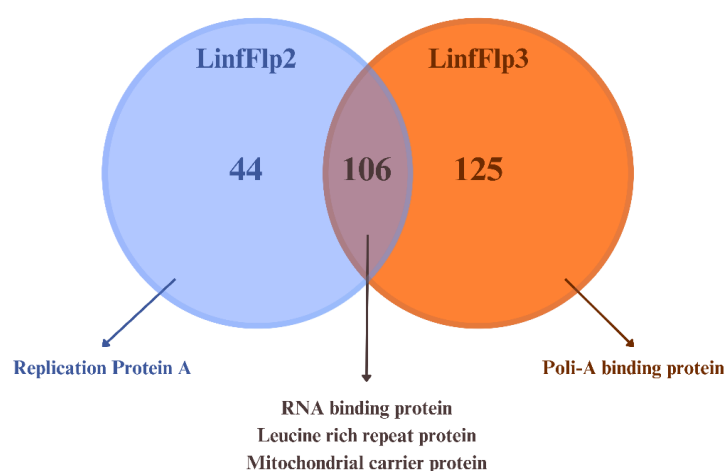


Figura 12. Diagrama de Venn dos interactomas de LinfFlp2 e LinfFlp3, com 44 proteínas exclusivas de LinfFlp2, 125 exclusivas de LinfFlp3 e 106 compartilhadas. Destaca-se *Replication protein A subunit (LINF_280024500)* como exclusiva de LinfFlp2 e *Poly(A)-binding protein 3 (LINF_250005800)* como exclusiva de LinfFlp3. Entre as proteínas compartilhadas, destacam-se *RNA-binding protein 29 (LINF_180007200)*, *Mitochondrial carrier protein (LINF_020012000)*, *WD domain - G-beta repeat (LINF_080009200)* e *Leucine-rich repeat protein (LINF_340011100)*.

Tabela 8. Proteínas associadas a LinfFlp2 e LinfFlp3 identificadas por imunoprecipitação seguida de espectrometria de massas. A tabela apresenta os parceiros exclusivos de LinfFlp2 e LinfFlp3 e os alvos compartilhados entre ambos os interactomas, de acordo com o valor de $\log_2\text{FC}$ e seus respectivos códigos no banco TriTrypDB.

Interactoma LinfFlp2	
Nomes	Códigos
<i>hypothetical protein – conserved- LinfFlp2</i>	LINF_150014400
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_170012600

<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_150005700
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_130006300
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_070011600
<i>rab11B GTPase - putative</i>	LINF_320024200
<i>glutamate dehydrogenase</i>	LINF_150018300
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_270025900
<i>proteasome regulatory non-ATP-ase subunit 3 - putative</i>	LINF_270021500
<i>protein phosphatase 2A catalytic subunit - putative</i>	LINF_320037900
<i>sterol 24-c-methyltransferase - putative</i>	LINF_360031200
<i>cytosolic leucyl aminopeptidase</i>	LINF_230017800
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_290018800
<i>proteasome regulatory non-ATPase subunit 11 - putative</i>	LINF_340012100
<i>Kinesin-13 3 - putative</i>	LINF_240011400
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_130013700
<i>isoleucyl-tRNA synthetase - putative</i>	LINF_360066000
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_180007600
<i>2-oxoglutarate dehydrogenase - E2 component - dihydrolipoamide succinyltransferase - putative</i>	LINF_280031300
<i>aminopeptidase - putative</i>	LINF_110012000
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_330033600
<i>RNA-binding protein - putative</i>	LINF_270028100
<i>60S ribosomal protein L26 - putative</i>	LINF_240026700
<i>cullin-like protein-like protein</i>	LINF_240029100
<i>dynamamin-1-like protein</i>	LINF_290029700
<i>polyadenylate-binding protein 1</i>	LINF_350055900
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_250031400
<i>40S ribosomal protein S23 - putative</i>	LINF_210018200
<i>quinonoid dihydropteridine reductase</i>	LINF_340051300
<i>casein kinase - putative</i>	LINF_350014800
<i>AMP-binding enzyme - putative</i>	LINF_300010900
<i>DEAD-box ATP-dependent RNA helicase - mitochondrial</i>	LINF_280027400
<i>type II (glutathione peroxidase-like) trypanothione peroxidase</i>	LINF_260013000

<i>Protein of unknown function (DUF1861) - putative</i>	LINF_100020400
<i>phosphoglycerate mutase family member 5 - putative</i>	LINF_360049800
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_150015700
<i>ATP synthase - putative</i>	LINF_210021600
<i>histone H2A - putative</i>	LINF_210016700
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_340014500
<i>glutamate dehydrogenase - putative</i>	LINF_280037300
<i>replication factor A - 51kDa subunit - putative</i>	LINF_280024500
<i>heat shock protein 20 - putative</i>	LINF_290032200
<i>pretranslocation protein - alpha subunit - putative</i>	LINF_110016500
<i>60S ribosomal protein L28 - putative</i>	LINF_110017300
Interactoma LinfFlp3	
Nomes	Códigos
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_310016300
<i>ras-like small GTPases – putative- LinfFlp3</i>	LINF_140018100
<i>ABC transport system ATP-binding protein - putative</i>	LINF_190012900
<i>proteasome regulatory non-ATPase subunit 6 - putative</i>	LINF_020008700
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_330037300
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_240021100
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_360054500
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_360078000
<i>Importin 1</i>	LINF_350028600
<i>phosphatidylinositol 4-kinase - putative</i>	LINF_340043300
<i>nucleoside transporter 1 - putative</i>	LINF_150019900
<i>Tetratricopeptide repeat - putative</i>	LINF_210010900
<i>oligosaccharyl transferase subunit - putative</i>	LINF_350016000
<i>stomatin-like protein</i>	LINF_050015800
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_320027600
<i>Archaic translocase outer mitochondrial membrane 40 - putative</i>	LINF_350054200
<i>eRF1 domain 1/eRF1 domain 2/eRF1 domain 3 - putative</i>	LINF_270024100
<i>importin alpha - putative</i>	LINF_300016800
<i>glycyl tRNA synthetase - putative</i>	LINF_360047300

<i>GRIP domain containing protein - putative</i>	LINF_110005600
<i>Temperature dependent protein affecting M2 dsRNA replication - putative</i>	LINF_210014100
<i>ADP-ribosylation factor family - putative</i>	LINF_140005500
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_180022100
<i>chaperonin alpha subunit - putative</i>	LINF_320040200
<i>RNA recognition motif (a.k.a. RRM - RBD - or RNP domain)/RNA recognition motif. (a.k.a. RRM - RBD - or RNP domain) - putative</i>	LINF_260020300
<i>pumilio protein 6 - putative</i>	LINF_330019100
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_330018200
<i>amidohydrolase - putative</i>	LINF_200022000
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_180013400
<i>Mak10 subunit - NatC N(alpha)-terminal acetyltransferase - putative</i>	LINF_170016800
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_260025600
<i>glycosomal transporter (GAT2) - putative</i>	LINF_330027100
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_170005000
<i>RNA recognition motif. (a.k.a. RRM - RBD - or RNP domain)/RNA recognition motif (a.k.a. RRM - RBD - or RNP domain) - putative</i>	LINF_340033000
<i>chaperone protein DNAj - putative</i>	LINF_350035100
<i>hydrolase-like protein</i>	LINF_170017700
<i>vacuolar-type Ca²⁺-ATPase - putative</i>	LINF_170012300
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_160020100
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_270012500
<i>Autophagy-related protein 24</i>	LINF_350029500
<i>nucleolar GTP-binding protein - putative</i>	LINF_330027200
<i>NmrA-like family/NADH(P)-binding/NAD dependent epimerase/dehydratase family/3-beta hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase family - putative</i>	LINF_340038800
<i>RNA helicase - putative</i>	LINF_210011700

<i>60S acidic ribosomal protein P0 - putative</i>	LINF_270020500
<i>proteasome regulatory non-ATPase subunit - putative</i>	LINF_290006100
<i>amino acid transporter aATP11 - putative</i>	LINF_270012700
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_310016200
<i>ruvb-like 1 DNA helicase - putative</i>	LINF_340041900
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_190017700
<i>ribosomal protein S29 - putative</i>	LINF_280028800
<i>N-acetyltransferase subunit Nat1 - putative</i>	LINF_360019100
<i>ATP-dependent RNA helicase SUB2 - putative</i>	LINF_210024300
<i>proline oxidase - mitochondrial precursor-like protein</i>	LINF_260021100
<i>prolyl-tRNA synthetase - putative</i>	LINF_180017600
<i>ruvB-like DNA helicase - putative</i>	LINF_340032100
<i>enoyl-CoA hydratase/Enoyl-CoA isomerase/3- hydroxyacyl-CoA dehydrogenase - putative</i>	LINF_330035300
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_260023200
<i>pentamidine resistance protein 1</i>	LINF_230007200
<i>PUF1 - putative</i>	LINF_360005400
<i>transaldolase - putative</i>	LINF_160013000
<i>Noc2p family - putative</i>	LINF_180021700
<i>Regulatory subunit of type II PKA R-subunit - putative</i>	LINF_350046300
<i>ubiquitin-conjugating enzyme E2 - putative</i>	LINF_340014800
<i>RNA-binding protein - putative</i>	LINF_170011800
<i>protein kinase A regulatory subunit</i>	LINF_130006500
<i>small myristoylated protein 4 - putative</i>	LINF_200018000
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_320017200
<i>transmembrane/endomembrane-like protein</i>	LINF_340044100
<i>phenylalanine-4-hydroxylase</i>	LINF_280018600
<i>Cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain containing protein - putative</i>	LINF_310018200
<i>pumilio protein 2 - putative</i>	LINF_180019600
<i>protein transport protein SEC13 - putative</i>	LINF_320005500
<i>UDP-glucose pyrophosphorylase</i>	LINF_180015200

<i>methionyl-tRNA synthetase</i>	LINF_210013900
<i>phosphoribosylpyrophosphate synthetase - putative</i>	LINF_330028000
<i>RNA-binding protein - putative</i>	LINF_350027200
<i>adenine phosphoribosyltransferase</i>	LINF_260006300
<i>small nuclear ribonucleoprotein SmD2</i>	LINF_330042000
<i>ATP synthase F1 subunit gamma protein - putative</i>	LINF_210027500
<i>proteasome regulatory ATPase subunit 5 - putative</i>	LINF_220011600
<i>ubiquitin-conjugating enzyme E2 - putative</i>	LINF_040011900
<i>translation initiation factor EIF-2B gamma subunit - putative</i>	LINF_090018100
<i>chaperonin containing t-complex protein - putative</i>	LINF_320015700
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_210023700
<i>40S ribosomal protein S19 protein - putative</i>	LINF_340033900
<i>Ubiquitin-2 like Rad60 SUMO-like/Ubiquitin family/Ubiquitin-like domain/Ribosomal L40e family - putative</i>	LINF_090015200
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_340012900
<i>elongation factor-1 gamma</i>	LINF_090016000
<i>ADP-ribosylation factor - putative</i>	LINF_310036600
<i>40S ribosomal protein S2</i>	LINF_320009600
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_340031500
<i>2-oxoglutarate dehydrogenase subunit - putative</i>	LINF_270015100
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_300005900
<i>60S acidic ribosomal protein P2 - putative</i>	LINF_300043000
<i>leucine carboxyl methyltransferase - putative</i>	LINF_360005800
<i>stress-induced protein sti1</i>	LINF_080016000
<i>poly(A)-binding protein 3</i>	LINF_250005800
<i>microtubule-associated protein - putative</i>	LINF_050008800
<i>fibrillarin</i>	LINF_360038800
<i>tricarboxylate carrier - putative</i>	LINF_010010800
<i>serine palmitoyltransferase-like protein</i>	LINF_340044900
<i>60S ribosomal protein L34 - putative</i>	LINF_180019400
<i>60S ribosomal protein L36 - putative</i>	LINF_210013000
<i>C-terminal motor kinesin - putative</i>	LINF_190007400

<i>vacuolar ATP synthase catalytic subunit A - putative</i>	LINF_340044200
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_340052400
<i>ATP synthase - putative</i>	LINF_360039100
<i>translation initiation factor IF-2 - putative</i>	LINF_330036700
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_130009500
<i>cation-transporting ATPase - putative</i>	LINF_070017000
<i>reticulon domain protein - 22 kDa potentially aggravating protein (paple22)</i>	LINF_300030900
<i>small glutamine-rich tetratricopeptide repeat protein - putative</i>	LINF_300032600
<i>glycosomal membrane protein - putative</i>	LINF_280029400
<i>histone H4</i>	LINF_020005100
<i>vesicular-fusion protein nsf - putative</i>	LINF_200013000
<i>Mitochondrial import receptor subunit ATOM69 - putative</i>	LINF_280028400
<i>long-chain-fatty-acid-CoA ligase - putative</i>	LINF_030007100
<i>small GTP-binding protein Rab11 - putative</i>	LINF_100015800
<i>DNA topoisomerase III - putative</i>	LINF_280024100
<i>5-histidylcysteine sulfoxide synthase - putative</i>	LINF_290015200
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_190010100
<i>high mobility group protein homolog tdp-1 - putative</i>	LINF_290013700
<i>cytochrome c oxidase VII - putative GeneDB:LmjF.25.1130</i>	LINF_250017400
<i>60S ribosomal protein L30</i>	LINF_350007500
<i>d-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase- protein</i>	LINF_340021200
Interactoma LinfFlp2 e LinfFlp3	
Nomes	Códigos
<i>voltage-dependent anion-selective channel - putative</i>	LINF_020009800
<i>mitochondrial carrier protein - putative</i>	LINF_020012000
<i>Heat shock protein 100 kDa</i>	LINF_020012400
<i>cAMP-specific phosphodiesterase - putative</i>	LINF_040005200
<i>actin</i>	LINF_040017600
<i>phosphoprotein phosphatase - putative</i>	LINF_050005900
<i>protein tyrosine phosphatase - putative</i>	LINF_050007700

<i>ATP synthase F1 - alpha subunit - putative</i>	LINF_050010000
<i>Ribosomal protein L19e - putative</i>	LINF_060009400
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_070005700
<i>ATP-dependent DEAD/H RNA helicase - putative</i>	LINF_070008800
<i>splicing factor ptsr1-like protein</i>	LINF_070014900
<i>RNA binding protein-like protein</i>	LINF_070016300
<i>WD domain - G-beta repeat - putative</i>	LINF_080009200
<i>hypothetical protein</i>	LINF_080015800
<i>beta tubulin</i>	LINF_080017700
<i>mitochondrial RNA binding protein 2</i>	LINF_090018500
<i>dehydrogenase-like protein</i>	LINF_100005800
<i>Nucleolar protein 56 - putative</i>	LINF_100007300
<i>seryl-tRNA synthetase - putative</i>	LINF_110005900
<i>pyruvate phosphate dikinase - putative</i>	LINF_110016000
<i>SKP1-like protein</i>	LINF_110018100
<i>cytochrome oxidase subunit IV - putative</i>	LINF_120011900
<i>leucyl-tRNA synthetase - putative</i>	LINF_130016000
<i>fatty acid elongase - putative</i>	LINF_140012300
<i>enolase</i>	LINF_140018000
<i>cytochrome-b5 reductase - putative</i>	LINF_150005400
<i>60S ribosomal protein L13a - putative</i>	LINF_150007100
<i>ribonucleoprotein p18 - mitochondrial precursor - putative</i>	LINF_150008100
<i>tryparedoxin peroxidase</i>	LINF_150019000
<i>Cyclic nucleotide-binding domain containing protein - putative</i>	LINF_150019300
<i>orotidine-5-phosphate decarboxylase/orotate</i>	
<i>phosphoribosyltransferase - putative</i>	LINF_160010700
<i>histone H3 - putative</i>	LINF_160010900
<i>carbamoyl-phosphate synthase - putative</i>	LINF_160011200
<i>kinesin - putative</i>	LINF_160020700
<i>elongation factor 1-alpha</i>	LINF_170005900
<i>META domain containing protein</i>	LINF_170015800
<i>RNA-binding protein 29 - putative</i>	LINF_180007200

<i>glycogen synthase kinase 3 - putative</i>	LINF_180007700
<i>60S ribosomal protein L10a - putative</i>	LINF_180011500
<i>Elongation factor Tu - mitochondrial - putative</i>	LINF_180012600
<i>gamma-glutamylcysteine synthetase - putative</i>	LINF_180022300
<i>40S ribosomal protein S2</i>	LINF_190005400
<i>ADP- ATP carrier protein 1 - mitochondrial precursor - putative</i>	LINF_190006800
<i>inosine-5'-monophosphate dehydrogenase</i>	LINF_190022000
<i>40S ribosomal protein S11 - putative</i>	LINF_200021000
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_210024400
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_220015900
<i>endoribonuclease L-PSP (pb5) - putative</i>	LINF_230007100
<i>3-ketoacyl-CoA thiolase - putative</i>	LINF_230014600
<i>mitochondrial RNA binding protein - putative</i>	LINF_230015400
<i>Ribosomal protein L22p/L17e - putative</i>	LINF_240005200
<i>protein phosphatase - putative</i>	LINF_250013300
<i>cyclophilin type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase</i>	LINF_250014900
<i>GTP-binding protein - putative</i>	LINF_250020400
<i>mitochondrial RNA binding complex 1 subunit - putative</i>	LINF_250021900
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_250022700
<i>60S ribosomal protein L7 - putative</i>	LINF_260006600
<i>heat shock 70-related protein 1 - mitochondrial precursor - putative</i>	LINF_260017400
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_260028100
<i>mitochondrial RNA binding protein 1</i>	LINF_270017500
<i>WD domain - G-beta repeat - putative</i>	LINF_270018900
<i>Archaic translocase outer mitochondrial membrane 46 kDa subunit - putative</i>	LINF_280014900
<i>40S ribosomal protein S14</i>	LINF_280015200
<i>ribosomal protein S20 - putative</i>	LINF_280015700
<i>heat shock 70-related protein 1 - mitochondrial precursor - putative</i>	LINF_280017800
<i>hsp70</i>	LINF_280035000

<i>ADP-ribosylation factor-like protein 3A - putative</i>	LINF_290014400
<i>histone H2A - putative</i>	LINF_290023900
<i>rab-GDP dissociation inhibitor - putative</i>	LINF_290029300
<i>metallo-peptidase - Clan MA(E) Family M1</i>	LINF_290030100
<i>ATP-dependent phosphofructokinase</i>	LINF_290032900
<i>pyridoxal kinase - putative</i>	LINF_300018100
<i>eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7-like protein</i>	LINF_300036000
<i>protein mkt1 - putative</i>	LINF_300040000
<i>ATP synthase - epsilon chain - putative</i>	LINF_300041800
<i>ribosomal protein L15 - putative</i>	LINF_300042300
<i>Pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump 1 - putative</i>	LINF_310018700
<i>3-ketoacyl-CoA thiolase-like protein - putative</i>	LINF_310023800
<i>ARM-like helical domain-containing protein</i>	LINF_310029900
<i>nuclear segregation protein - putative</i>	LINF_320005100
<i>dynein - putative</i>	LINF_320016300
<i>ribosomal protein L3 - putative</i>	LINF_320038800
<i>3-hydroxyisobutyryl-coenzyme a hydrolase-like protein</i>	LINF_320043700
<i>heat shock protein 83-17</i>	LINF_330009000
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_330013800
<i>60S ribosomal protein L37</i>	LINF_330028300
<i>leucine-rich repeat protein - putative</i>	LINF_340011100
<i>NADH-dependent fumarate reductase - putative</i>	LINF_350016600
<i>threonyl-tRNA synthetase - putative</i>	LINF_350019000
<i>phospholipase A1 - putative</i>	LINF_350035500
<i>ATP-dependent RNA helicase - putative</i>	LINF_350036300
<i>Gim5A protein - putative</i>	LINF_350042400
<i>T-complex protein 1 - eta subunit - putative</i>	LINF_350044000
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_360010100
<i>ubiquitin/ribosomal protein S27a - putative</i>	LINF_360011600
<i>fructose-1 -6-bisphosphate aldolase</i>	LINF_360018400
<i>serine/threonine protein kinase - putative</i>	LINF_360021400

<i>chaperonin HSP60 - mitochondrial precursor</i>	LINF_360027200
<i>tyrosine aminotransferase</i>	LINF_360030700
<i>2-oxoglutarate dehydrogenase subunit - putative</i>	LINF_360043300
<i>S-adenosylhomocysteine hydrolase</i>	LINF_360048000
<i>oxidoreductase - putative</i>	LINF_360050900
<i>mkiaa0324 protein-like protein</i>	LINF_360068000
<i>hypothetical protein - conserved</i>	LINF_360070400

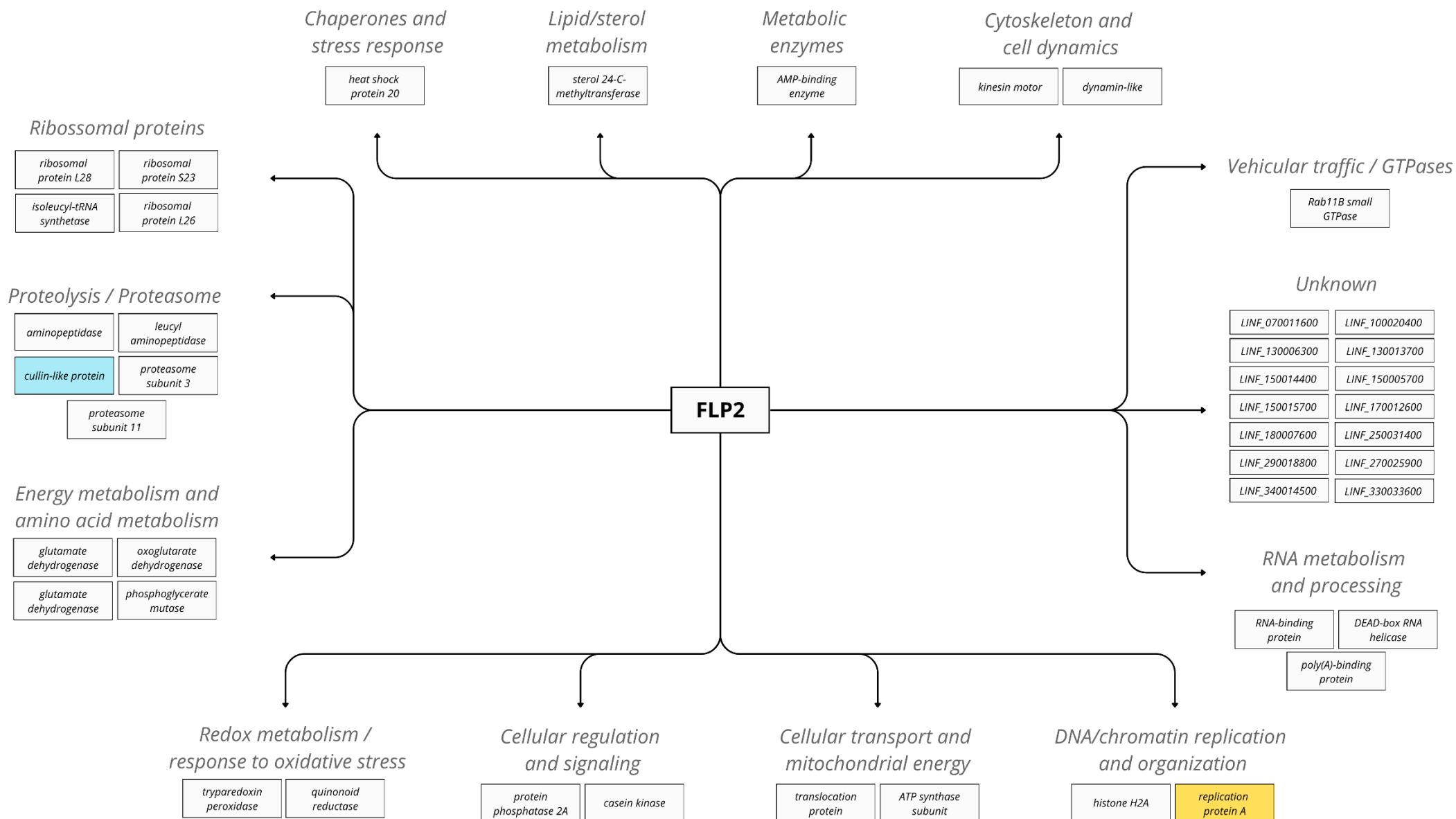


Figura 13. Interactoma de LinfFlp2 evidenciando a distribuição das proteínas identificadas em diferentes grupos funcionais. Há proteínas associadas a processos como regulação da expressão gênica, metabolismo de RNA, síntese proteica, metabolismo energético e tráfego intracelular. Destacam-se, em azul, *cullin-like protein-like protein* (LINF_240029100) e, em amarelo, *Replication protein A subunit* (LINF_280024500).

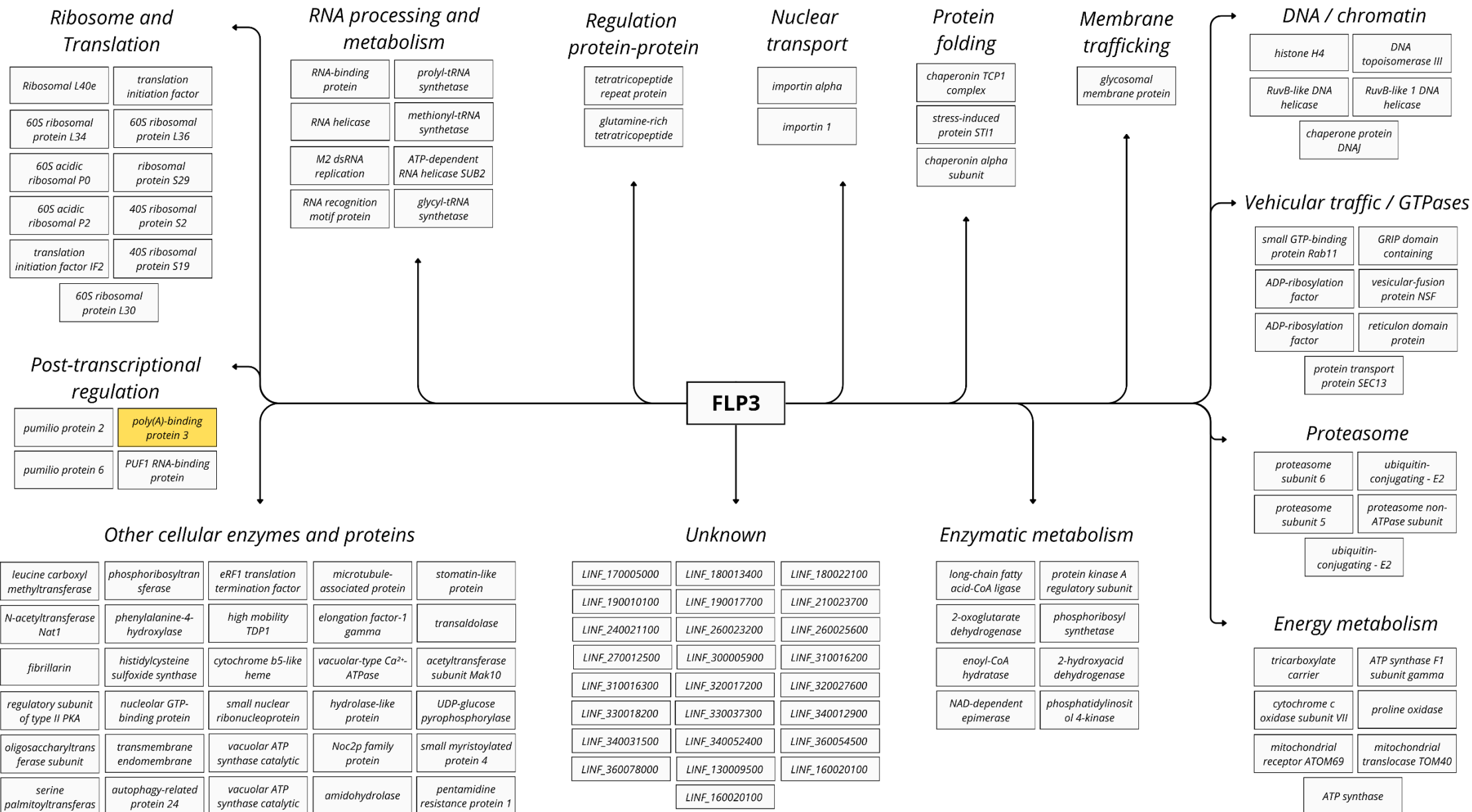


Figura 14. Interactoma de LinfFlp3 evidenciando a distribuição das proteínas identificadas em diferentes grupos funcionais, incluindo metabolismo de RNA, síntese proteica, controle de qualidade proteica, metabolismo energético e tráfego intracelular. Destaca-se, em amarelo, *Poly(A)-binding protein 3* (LINF_250005800).

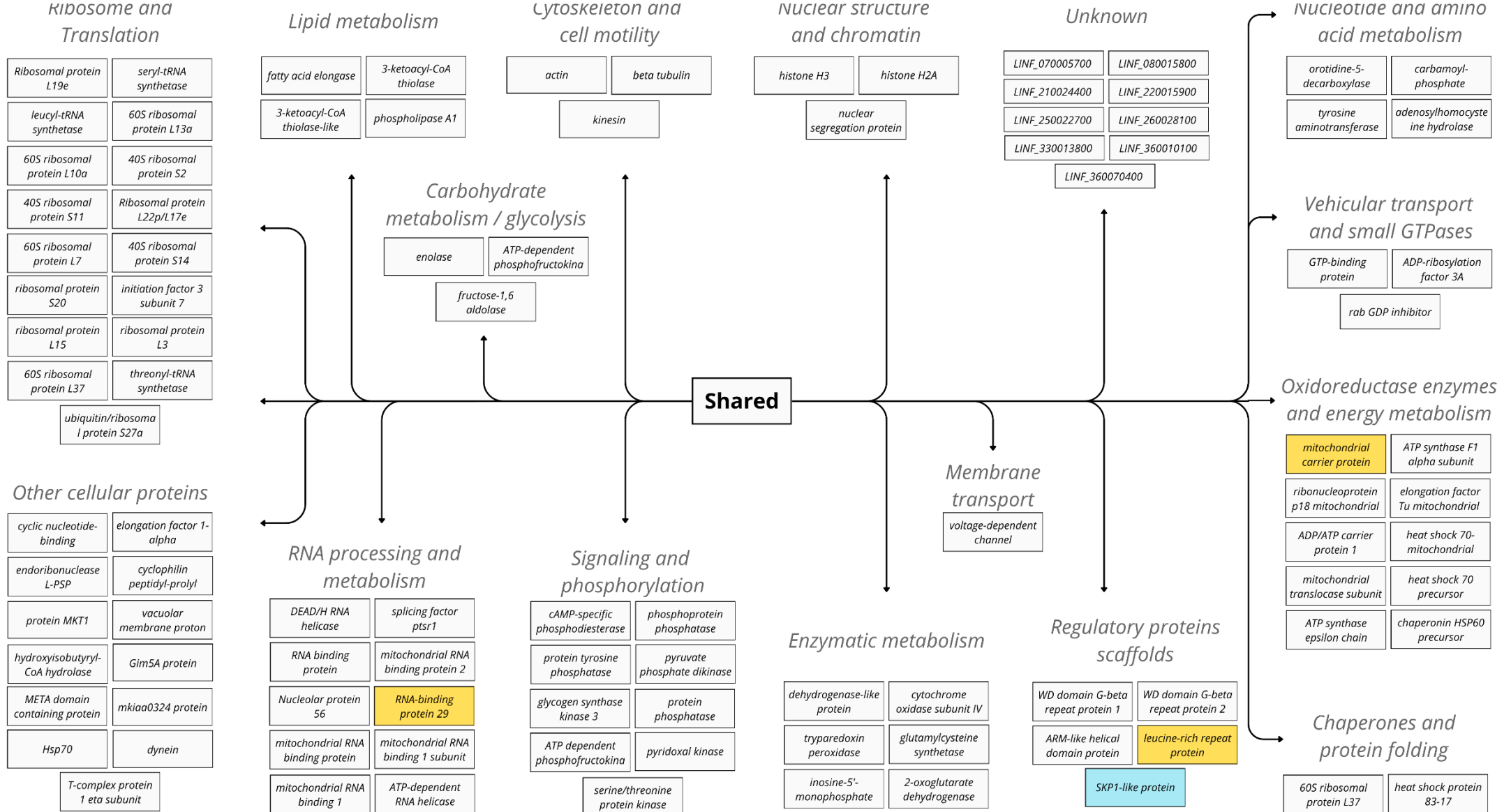


Figura 15. Interactoma das proteínas compartilhadas entre LinF1p2 e LinF1p3, evidenciando a distribuição dos alvos em diferentes grupos funcionais, incluindo metabolismo de RNA, síntese proteica, metabolismo energético, organização celular e tráfego intracelular. Destacam-se, em amarelo, *RNA-binding protein 29* (LINF_180007200), *Mitochondrial carrier protein* (LINF_020012000), *WD domain - G-beta repeat* (LINF_080009200), *Leucine-rich repeat protein* (LINF_340011100) e, em azul, *SKP1-like protein* (LINF_110018100).

Dentre as proteínas identificadas nos interactomas de LinfFlp2 e LinfFlp3, destaca-se a presença da proteína *SKP1-like protein (LINF_110018100)* entre os alvos compartilhados, assim como da *cullin-like protein-like protein (LINF_240029100)*, reforçando a consistência dos dados obtidos, uma vez que essas proteínas são componentes centrais do complexo SCF (SKP1–Cullin–F-box), no qual as F-box-like proteins (FLPs) atuam como adaptadoras no recrutamento de substratos para ubiquitinação.

A identificação adicional de proteínas associadas a esse sistema, como possivelmente a *Leucine-rich repeat protein – putative (LINF_340011100)*, ortóloga de proteínas F-box contendo domínios LRR em eucariotos, bem como das proteínas *proteasome regulatory non-ATPase subunit 3 – putative (LINF_270021500)* e *proteasome regulatory non-ATPase subunit 11 – putative (LINF_340012100)* no interactoma de LinfFlp2, e das proteínas *proteasome regulatory non-ATPase subunit 6 – putative (LINF_020008700)*, *proteasome regulatory non-ATPase subunit – putative (LINF_290006100)* e *proteasome regulatory ATPase subunit 5 – putative (LINF_220011600)*, além de enzimas do tipo *ubiquitin-conjugating enzyme E2 – putative (LINF_040011900; LINF_090015200)* no interactoma de LinfFlp3, reforça a associação funcional de LinfFlp2 e LinfFlp3 com o sistema ubiquitina-proteassoma e valida a robustez experimental dos interactomas obtidos.

Os dados também evidenciam uma forte representação de proteínas ligadas ao controle de qualidade proteica e dobramento, especialmente no interactoma de LinfFlp3. Destacam-se *chaperonin containing TCP1 complex – putative (LINF_320015700)*, *stress-induced protein STII (LINF_080016000)* e *heat shock protein 83-17 (LINF_330009000)*. A presença dessas chaperonas, aliada à identificação de múltiplos componentes do proteassoma, reforça a hipótese de que LinfFlp3 esteja particularmente associada a mecanismos de controle de qualidade proteica, incluindo o reconhecimento e direcionamento de proteínas mal dobradas para degradação.

Outro aspecto importante é o enriquecimento de proteínas associadas ao maquinário de tradução e ribossomos, especialmente no interactoma de LinfFlp3 e no conjunto compartilhado. Entre essas, destacam-se *40S ribosomal protein S19 – putative (LINF_340033900)*, *60S acidic ribosomal protein P2 – putative (LINF_300043000)*, *ribosomal protein L3 – putative (LINF_320038800)* e *40S ribosomal protein S14 (LINF_280015200)*. A presença consistente dessas proteínas sugere que LinfFlp2 e LinfFlp3 possam estar funcionalmente associadas ao controle da tradução, possivelmente regulando a estabilidade de componentes ribossomais ou de fatores de tradução. Essa hipótese é reforçada pela identificação de fatores como *elongation*

factor-1 gamma (LINF_090016000) e *eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7-like protein (LINF_300036000)*, indicando uma possível atuação das FLPs na modulação da eficiência traducional ou no controle de qualidade de proteínas recém-sintetizadas.

Corroborando essa ideia, foi observado um conjunto robusto de proteínas envolvidas no metabolismo e processamento de RNA, incluindo helicases e proteínas de ligação a RNA, como *ATP-dependent RNA helicase SUB2 – putative (LINF_210024300)*, *RNA-binding protein 29 (LINF_180007200)*, *Poly(A)-binding protein 3 (LINF_250005800)* e *mitochondrial RNA binding protein 1 (LINF_270017500)*. Esses componentes reforçam a hipótese de que as FLPs atuam de forma relevante em níveis pós-transcricionais da regulação gênica, influenciando processos como splicing, exportação nuclear, estabilidade e tradução de mRNAs. De forma complementar, a identificação de *Replication protein A subunit (LINF_280024500)* sugere que essa atuação regulatória pode se estender a eventos nucleares mais amplos, incluindo replicação e reparo de DNA. Essa conexão entre proteínas envolvidas no metabolismo de RNA e na dinâmica do DNA aponta para um possível papel integrador das FLPs na coordenação da expressão gênica em múltiplos níveis, desde a manutenção da integridade genômica até o controle do destino dos transcritos.

Outro eixo funcional importante identificado nos interactomas é o metabolismo energético e a função mitocondrial. Foram detectadas diversas proteínas mitocondriais, incluindo *ATP synthase F1 alpha subunit – putative (LINF_050010000)*, *ADP/ATP carrier protein 1 mitochondrial precursor (LINF_190006800)* e *mitochondrial outer membrane translocase subunit – putative (LINF_280014900)*, além de enzimas metabólicas como *2-oxoglutarate dehydrogenase subunit – putative (LINF_270015100)*. Esse conjunto inclui ainda *Mitochondrial carrier protein (LINF_020012000)*, envolvida no transporte de metabólitos através da membrana mitocondrial, reforçando a possível participação das FLPs na regulação da homeostase energética celular. Esses achados sugerem que LinfFlp2 e LinfFlp3 podem estar envolvidas na regulação indireta da atividade mitocondrial, possivelmente modulando a estabilidade de proteínas-chave para o metabolismo energético e adaptação metabólica do parasito.

A presença de proteínas associadas ao tráfego vesicular e sistema endomembranar constitui outro achado relevante. Entre elas, destacam-se *small GTP-binding protein Rab11 – putative (LINF_100015800)*, *ADP-ribosylation factor family – putative (LINF_140005500)* e *protein transport protein SEC13 – putative (LINF_320005500)*. Essas proteínas desempenham papéis centrais na dinâmica de vesículas, transporte intracelular e organização do Golgi e do retículo endoplasmático. Adicionalmente, a presença de proteínas contendo domínios WD,

como *WD domain - G-beta repeat (LINF_080009200)*, sugere a participação das FLPs em complexos multiproteicos, atuando como plataformas de interação em processos de sinalização e organização celular. A associação com esses componentes sugere que as FLPs podem participar da regulação do tráfego de proteínas e da manutenção da arquitetura do sistema endomembranar, possivelmente coordenando a degradação seletiva de proteínas envolvidas nesses processos.

Outro grupo funcional relevante corresponde às enzimas metabólicas centrais, abrangendo vias como glicólise, metabolismo de aminoácidos e lipídios. Exemplos incluem *fructose-1,6-bisphosphate aldolase (LINF_360018400)*, *tyrosine aminotransferase (LINF_360030700)* e *fatty acid elongase – putative (LINF_140012300)*. A diversidade dessas enzimas sugere que as FLPs podem influenciar o metabolismo celular de forma ampla, possivelmente por meio da regulação da estabilidade de enzimas-chave, contribuindo para a adaptação metabólica do parasito a diferentes condições ambientais.

Adicionalmente, foram identificadas proteínas envolvidas em sinalização celular, como *glycogen synthase kinase 3 – putative (LINF_180007700)* e *serine/threonine protein kinase – putative (LINF_360021400)*, indicando que LinfFlp2 e LinfFlp3 podem também participar de cascatas regulatórias que modulam respostas celulares a estímulos ambientais. Esse papel regulatório é consistente com a função das FLPs em modular a degradação de proteínas sinalizadoras.

Proteínas associadas ao citoesqueleto e motilidade celular, como *actin (LINF_040017600)*, *beta tubulin (LINF_080017700)* e *kinesin – putative (LINF_160020700)*, também foram identificadas, sugerindo uma possível conexão com processos estruturais, divisão celular e organização intracelular. A regulação desses componentes pode ser essencial para a morfologia e infectividade do parasito.

Por fim, destaca-se a presença significativa de proteínas hipotéticas ou não caracterizadas, especialmente no interactoma de LinfFlp3. Esse grupo representa uma fração importante dos dados e sugere a existência de novos componentes funcionais ainda não descritos na biologia de *Leishmania*. A caracterização dessas proteínas possivelmente pode revelar novos mecanismos regulatórios associados às FLPs.

Em conjunto, os resultados indicam que LinfFlp2 e LinfFlp3 atuam como elementos centrais em uma rede funcional que integra tradução, metabolismo de RNA, metabolismo energético, tráfego vesicular, sinalização celular e controle de qualidade proteica. A sobreposição parcial entre os interactomas, combinada com a presença de proteínas exclusivas, sugere que essas FLPs desempenham papéis tanto complementares quanto específicos. Essa

organização funcional pode conferir ao parasito maior robustez e flexibilidade adaptativa, especialmente em processos dependentes da ubiquitinação e da regulação dinâmica do proteoma.

4.3- Análise funcional dos genes *LinFFLP2* e *LinFFLP3*

Para avaliar a importância dos genes *LinFFLP2* e *LinFFLP3* em *L. infantum*, realizamos o nocaute destes genes por CRISPR-Cas9 (dados obtidos pela estudante de IC do LBqC Taissa de Oliveira de Castro). Para *LinFFLP2*, após seleção com os antibióticos realizamos a validação da entrada dos cassetes de reparo contendo os genes de resistência Puro e Blast (**Figura 16A**). Para avaliar o impacto no nocaute no crescimento dos promastigotas, realizamos análise da curva de crescimento por 9 dias em comparação a linhagem controle Cas9T7 (**Figura 16B**). Observamos que não houve diferença nos crescimentos da linhagem nocaute para a controle, sugerindo que este gene não esteja relacionado a proliferação do parasito ou que outra LinFFlp como a LinFFlp3 poderia estar realizando sua função, dado a redundância de parceiros identificados entre LinFFlp2 e LinFFlp3.

O nocaute do gene *LinFFLP3* não gerou linhagem viável, sugerindo que este possa ser um gene essencial. Com o objetivo de reduzir a expressão do gene *LinFFLP3*, realizamos o nocaute de apenas uma das cópias, gerando uma linhagem *single knockout* (SKO) resistente ao antibiótico blasticidina. Além disso, realizamos o nocaute duplo de *LinFFLP3* (DKO) na linhagem *LinFFLP3-HA*, cuja expressão é regulada pelo promotor ribossomal 18S (**Figura 17A**). As análises de crescimento de promastigotas revelaram que as linhagens SKO *LinFFLP3* e DKO *LinFFLP3* não apresentaram diferenças significativas entre si, tampouco em comparação ao controle *L. infantum* Cas9/T7 (**Figura 17B**). De forma consistente, a análise do ciclo celular (**Figuras 17C–D**) também não evidenciou diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens, conforme determinado por *one-way* ANOVA. Os histogramas de conteúdo de DNA demonstram perfis semelhantes entre as amostras, tanto na sobreposição das triplicatas quanto no *merge* de todas as replicatas, com distribuição comparável das células nas fases G1, S e G2/M, corroborando a ausência de alterações detectáveis no ciclo celular entre os grupos avaliados. Esses resultados sugerem que a presença de um único alelo funcional de *LinFFLP3* é suficiente para sustentar adequadamente as funções dessa proteína, sem comprometer o crescimento, morfologia e a proliferação do parasito, ao menos na fase promastigota. Também podemos especular que LinFFlp2 possa estar realizando algumas das funções de LinFFlp3, uma vez que compartilham de substratos. No entanto, embora tenhamos

realizado o SKO *LinfFLP3*, não foi feito ensaios para validar a redução de sua expressão gênica.

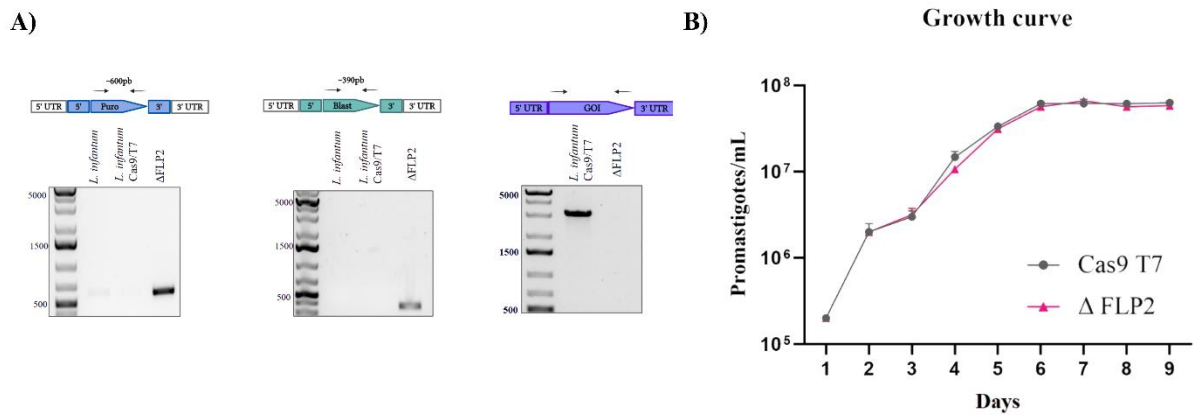


Figura 16. Nocaute gênico de *LinfFLP2* e análise de crescimento **A)** Confirmação do nocaute através da amplificação do cassete de reparo contendo o gene de resistência à puromicina e blasticidina, além da ausência do gene *LinfFLP2*. **B)** Curva de crescimento da linhagem *L. infantum LinfFLP2* em relação à linhagem controle *L. infantum Cas9/T7*.

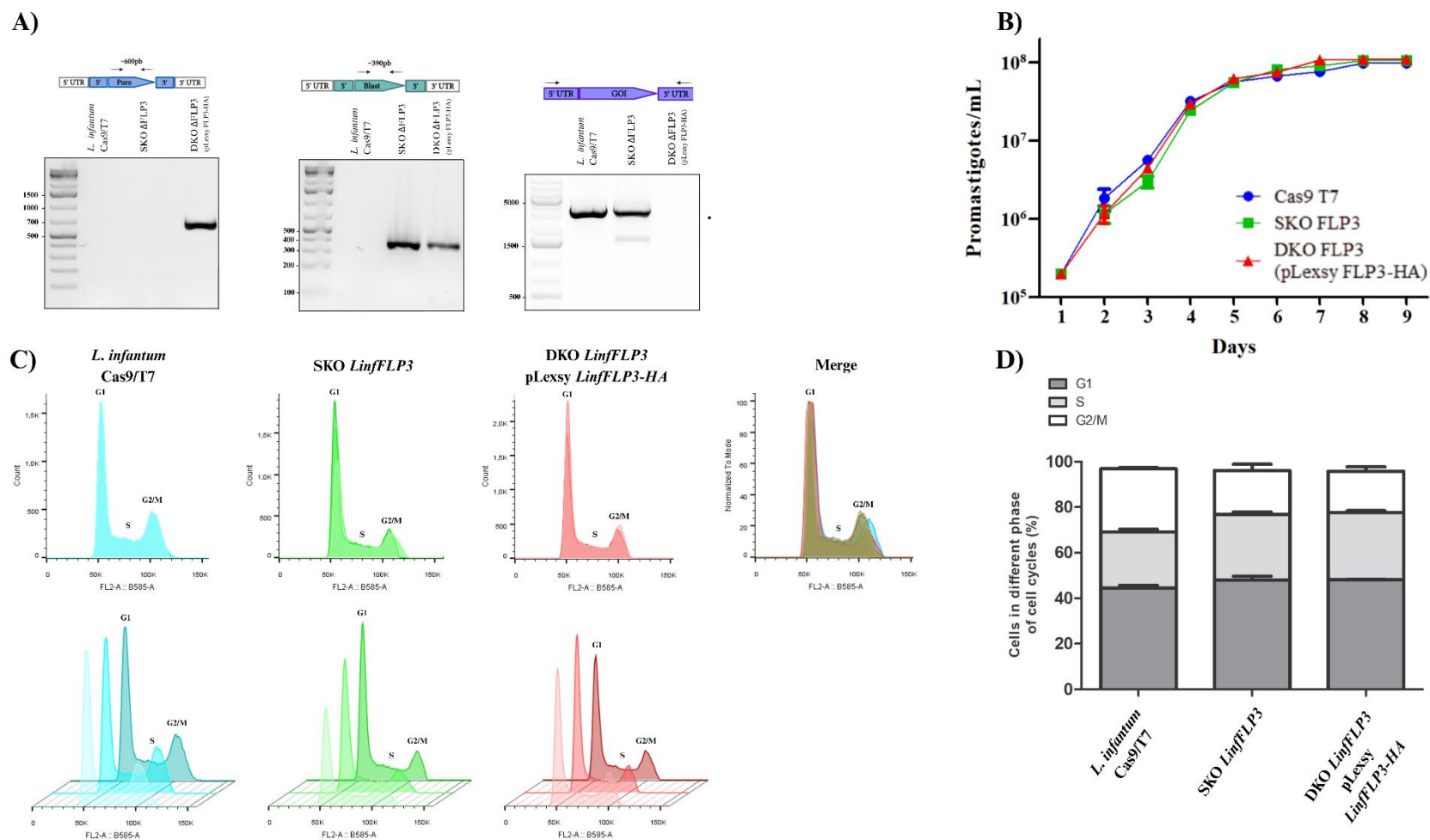


Figura 17. Nocaute gênico de *LinfFLP3* e análise de crescimento e ciclo celular de promastigotas. **A)** Confirmação do nocaute através da amplificação do cassette de reparo contendo apenas o gene de resistência à blasticidina no SKO *LinfFLP3* e puromicina e blasticidina no DKO *LinfFLP3*, além da ausência do gene *LinfFLP3*. **B)** Curva de crescimento das linhagens *L. infantum* SKO *LinfFLP3* e DKO *LinfFLP3* em relação à linhagem controle *L. infantum* Cas9/T7. **C)** Análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo utilizando software FlowJo, em que os histogramas da linha superior representam o *overlay* das triplicatas biológicas de cada amostra: *L. infantum* Cas9/T7 (azul), SKO *LinfFLP3* (verde) e DKO *LinfFLP3* pLexy *LinfFLP3*-HA (vermelho). O último gráfico da linha superior mostra o *merge* de todas as replicatas de todas as amostras, permitindo comparação direta entre os perfis. Os gráficos da linha inferior apresentam as distribuições individuais em visualização tridimensional para cada condição. **D)** Distribuição percentual das células nas diferentes fases do ciclo celular de cada linhagem. As barras representam a média das triplicatas biológicas, e os segmentos indicam a proporção de células em cada fase. As barras de erro correspondem ao desvio padrão entre as replicatas. A análise estatística foi realizada por *one-way ANOVA*, não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

4.4. – Clonagem e avaliação de interação das proteínas parceiras identificadas nos interactomas de LinfFlp2 e LinfFlp3

Dentre as proteínas parceiras identificadas nos interactomas de LinfFlp2 e LinfFlp3, estabelecemos os seguintes critérios para a escolha dos parceiros para validação: estudos prévios e presença no conjunto dos genes nocauteados de *L. mexicana* no banco de dados [LeishGEM](#); ter funções biológicas, processos celulares e vias metabólicas potencialmente associadas a essas LinfFlps. Utilizando esses critérios, foram selecionadas as seguintes proteínas para validação:

Tabela 9. Seleção de genes para validação das interações nos interactomas de *LinfFLP2* e *LinfFLP3*, com base nos critérios estabelecidos.

Genes	Função principal	Interactoma
<i>Mitochondrial carrier protein</i> (LINF_020012000)	Transporte mitocondrial; essencial para divisão do cinetoplasto em <i>Trypanosoma brucei</i> ⁴⁷	LinfFlp2 e LinfFlp3
<i>Replication protein A subunit</i> (LINF_280024500)	Estabilização de ssDNA, reparo e replicação do DNA em <i>Trypanosoma cruzi</i> ⁴⁸	LinfFlp2
<i>RNA-binding protein 29</i> (LINF_180007200)	Regulação pós-transcricional da expressão gênica; controle do ciclo de vida e resposta a estresse em <i>triptanosomatídeos</i> e <i>Leishmania</i> ⁴⁹	LinfFlp2 e LinfFlp3
<i>WD domain - G-beta repeat</i> (LINF_080009200)	Plataforma de interações proteína-proteína e montagem de complexos; presente na matriz mitocondrial de <i>Trypanosoma cruzi</i> ⁵⁰	LinfFlp3 e LinfFlp2
<i>Leucine-rich repeat protein</i> (LINF_340011100)	Interações proteína-proteína, possível regulação da ubiquitinação em <i>Leishmania</i> .	LinfFlp2 e LinfFlp3
<i>Poly(A)-binding protein 3</i> (LINF_250005800)	Ligação à cauda poliadenilada dos mRNAs, regulação de estabilidade e processamento em <i>Trypanosoma brucei</i> ⁵¹	LinfFlp3

Para avaliação da interação em células HEK293T, cada um dos genes e o vetor pcDNA3.1-N-myc foram amplificados por PCR gerando fragmentos do tamanho esperado (**Figura 18**). Os insertos foram ligados ao vetor por meio do sistema Gibson (NEB) e após transformação e seleção das colônias, a presença do inserto foi confirmada por PCR. A clonagem foi confirmada por PCR de colônia, revelando bandas compatíveis com os tamanhos

esperados (**Figura 19**). Estas construções foram sequenciadas e confirmaram as clonagens (**Anexo 2**).

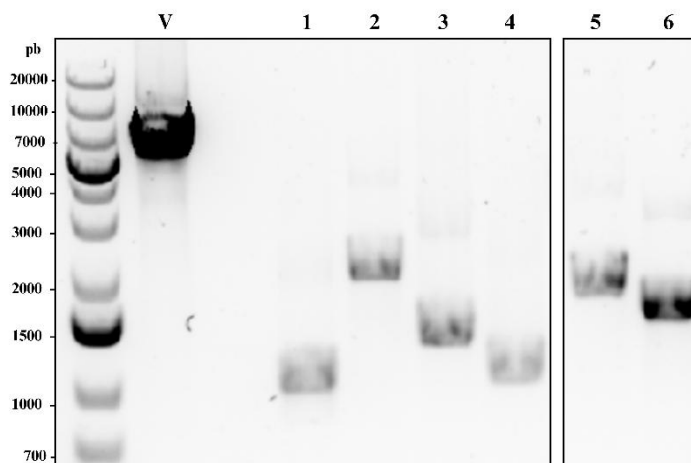


Figura 18. PCR de amplificação dos insertos e vetor linearizado. Os insertos foram amplificados através do genoma e o vetor foi amplificado através do pcDNA3.1-N-myc na temperatura de anelamento 58°C e resolvidos em gel de agarose 0,8%. Os tamanhos respectivos para cada inserto são: **V)** pcDNA3.1(+)-N-myc linearizado → 5.500 pb; **1)** *Putative mitochondrial carrier protein* (LINF_020012000) → 942 pb; **2)** *Replication protein A subunit* (LINF_280024500) → 1.404 pb; **3)** *RNA-binding protein 29* (LINF_180007200) → 1.230 pb; **4)** *WD domain - G-beta repeat* (LINF_080009200) → 966 pb; **5)** *Leucine-rich repeat protein* (LINF_340011100) → 1.866 pb e **6)** *Poly(A)-binding protein 3* (LINF_250005800) → 1.635 pb.

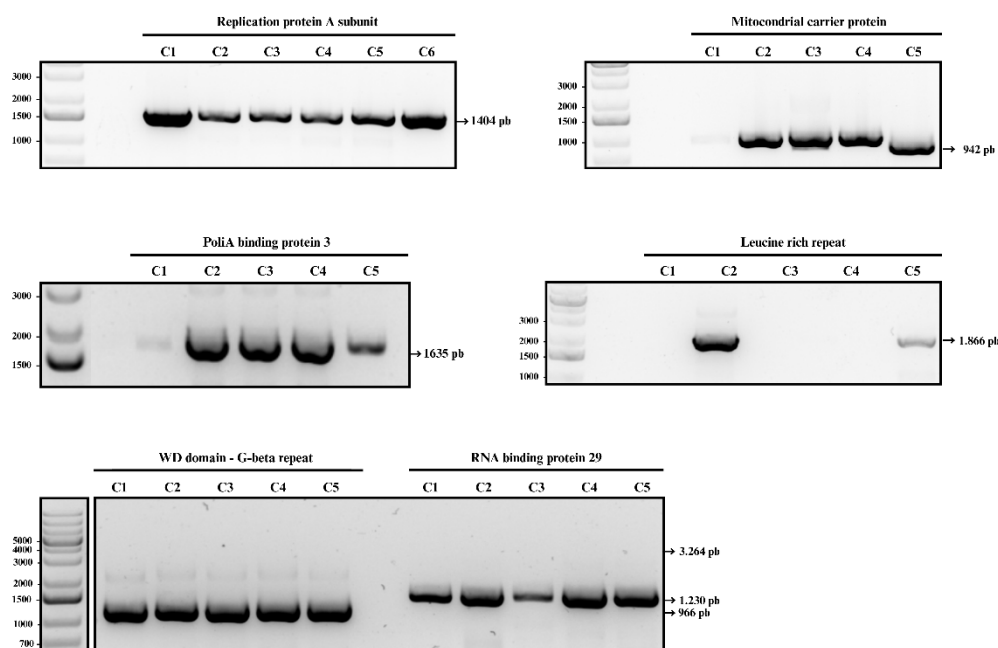


Figura 19. PCR de colônia para confirmação dos clones isolados de cada gene. Após seleção, os clones foram isolados e diluídos para serem utilizados como *template* na reação de PCR. As bandas observadas foram as mesmas daquelas que foram obtidas na amplificação dos insertos previamente descritos, confirmando a clonagem destes genes.

Para avaliar a expressão e estabilidade de cada proteína parceira em fusão com myc, células HEK 293T foram transfectadas separadamente com cada plasmídeo clonado. Extratos proteicos foram obtidos e resolvidos em SDS-PAGE seguido por *western blotting* com anticorpos anti-myc. Os resultados obtidos demonstraram que as proteínas foram expressas com a massa molecular esperada (**Figura 20**).

Adicionalmente, a expressão em HEK293T possibilitou avaliar a viabilidade do sistema para futuros ensaios de interação proteína–proteína, como co-imunoprecipitação, garantindo que as proteínas estivessem corretamente expressas e detectáveis em um contexto celular eucariótico.

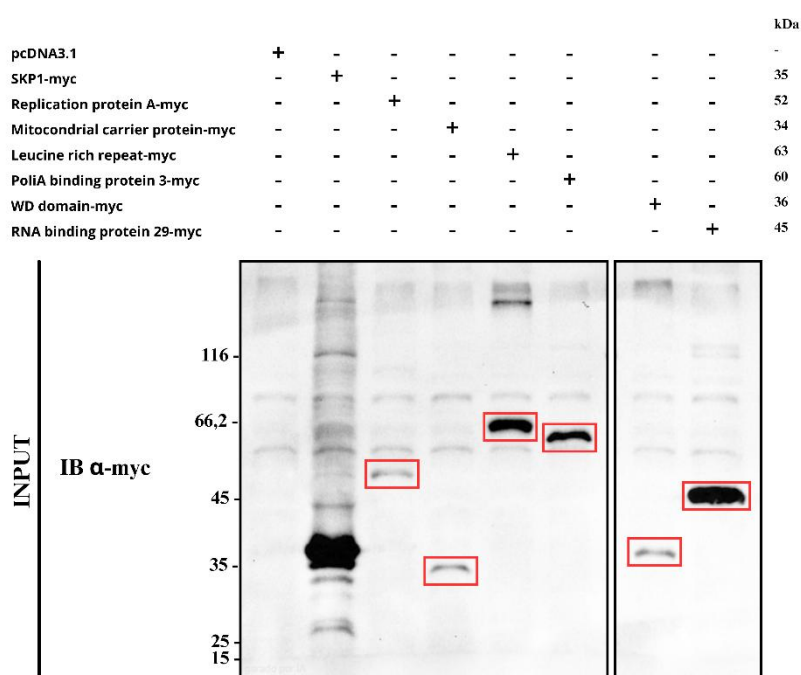


Figura 20. Análise da expressão das proteínas parceiras fusionadas à tag myc em células de mamífero HEK293T. Extratos totais foram avaliados por *western blot* utilizando anticorpo anti-myc. Os pesos moleculares esperados das proteínas recombinantes são: *Replication Protein A* (52 kDa), *Mitochondrial carrier protein* (34 kDa), *Leucine-rich repeat protein* (63 kDa), *Poly(A)-binding protein 3* (60 kDa), *WD domain-containing protein* (36 kDa) e *RNA-binding protein 29* (45 kDa).

4.5. – Co-imunoprecipitação de células HEK293T transfectadas

Com o intuito de validar os resultados obtidos por espectrometria de massas, nos quais foram identificadas proteínas potencialmente associadas aos interactomas de LinfFlp2 e LinfFlp3, foram realizados ensaios de interação co-imunoprecipitação (Co-IP) em células HEK293T, seguidos de *western blot*. Para LinfFlp2, foram avaliadas as interações com *RNA-binding protein 29* (*LINF_180007200* – 45 kDa), *Mitochondrial carrier protein*

(*LINF_020012000* – 34 kDa), *Leucine-rich repeat protein* (*LINF_340011100* – 63 kDa) e *Replication protein A subunit* (*LINF_280024500* – 52 kDa). Os resultados de *western blot* do eluído não evidenciaram interação direta entre LinfFlp2 e nenhuma dessas proteínas nas condições experimentais testadas (**Figura 21**).

De forma semelhante, para LinfFlp3, foram analisadas as interações com *RNA-binding protein 29* (*LINF_180007200*), *Mitochondrial carrier protein* (*LINF_020012000*), *Leucine-rich repeat protein* (*LINF_340011100*) e *Poly(A)-binding protein 3* (*LINF_250005800* – 60 kDa). Os resultados indicaram ausência de interação direta com a maioria das proteínas testadas; no entanto, foi observada uma possível interação entre LinfFlp3 e *Leucine-rich repeat protein*, sugerindo que essa proteína possa atuar como um parceiro específico ou potencial substrato (**Figura 22**).

Em conjunto, esses achados indicam que, embora diversas proteínas tenham sido identificadas nos interactomas por abordagens proteômicas, nem todas estabelecem interações diretas com as LinfFlps nas condições testadas. Essas associações podem ser indiretas, transitórias ou dependentes de contextos celulares específicos, além de possivelmente ocorrerem no contexto de complexos multiproteicos.

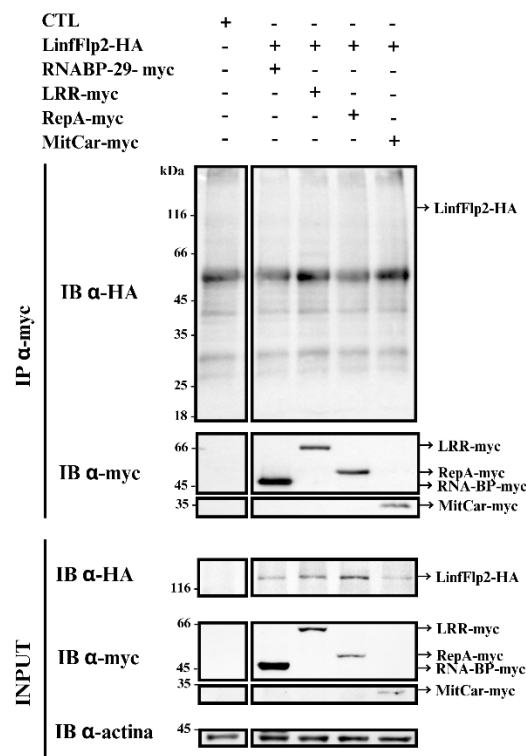


Figura 21. Ensaio de interação em células HEK293T entre a proteína LinfFlp2 com as *RNA-binding protein 29* (*LINF_180007200*), *Mitochondrial carrier protein* (*LINF_020012000*), *Leucine-rich repeat protein* (*LINF_340011100*) e *Replication protein A subunit*

(*LINF_280024500*). Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos descrito acima e a IP foi realizada com resina agarose anti-myc.

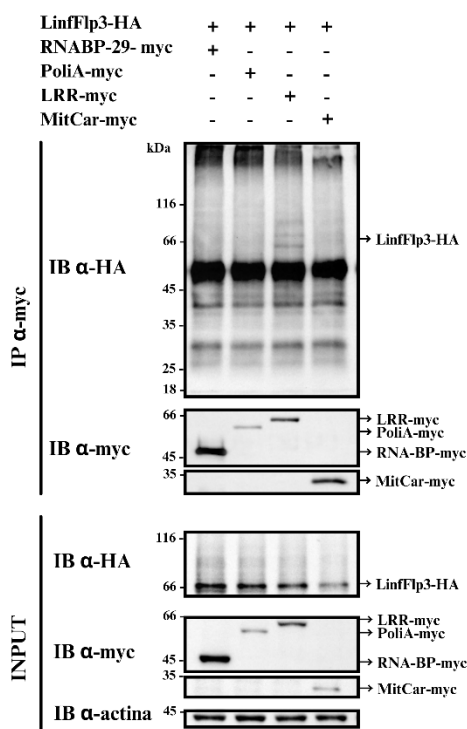


Figura 22. Ensaio de interação em células HEK293T entre a proteína LinfFlp3 com as *RNA-binding protein 29* (*LINF_180007200*), *Mitochondrial carrier protein* (*LINF_020012000*), *Leucine-rich repeat protein* (*LINF_340011100*) e *Poly(A)-binding protein 3* (*LINF_250005800*). Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos descrito acima e a IP foi realizada com resina agarose anti-myc.

4.6. – Localização intracelular das proteínas LinfFlp2-HA e LinfFlp3-HA

A análise por microscopia confocal revelou que as proteínas LinfFlp2 e LinfFlp3, destacadas em verde, apresentam um padrão de distribuição predominantemente citoplasmático, com discreto enriquecimento perinuclear e sinal pontilhado ao longo da célula, sem marcação nos flagelos (**Figura 23**). Esse perfil, aliado à identificação de múltiplas proteínas de ligação a RNA e fatores da maquinaria traducional, sugere que essas proteínas possam estar associadas com retículo endoplasmático na região perinuclear e/ou com estruturas citoplasmáticas especializadas, como glicossomos e/ou grânulos de RNA (**Figura 24A e B**), presentes constitutivamente em tripanossomatídeos⁵², sendo compatível com a identificação de várias proteínas da família *RNA binding protein*, como a *RNA-binding protein 29* (*LINF_180007200*), e a *Poly(A)-binding protein 3* (*LINF_250005800*).

Além disso, a sobreposição espacial entre LinfFlp2 e LinfFlp3 reforça a possível redundância funcional parcial e/ou atuação coordenada, em concordância com o elevado

número de proteínas compartilhadas entre seus interactomas. Em conjunto, a integração dos dados de localização subcelular e dos interactomas indica que LinfFlp2 e LinfFlp3 atuam predominantemente em compartimentos citoplasmáticos possivelmente associados à regulação pós-transcricional, que é o principal mecanismo de controle da expressão gênica neste parasito, sugerindo seu envolvimento na integração entre o metabolismo de RNA e mecanismos de controle de qualidade proteica, como a degradação mediada pelo SUP.

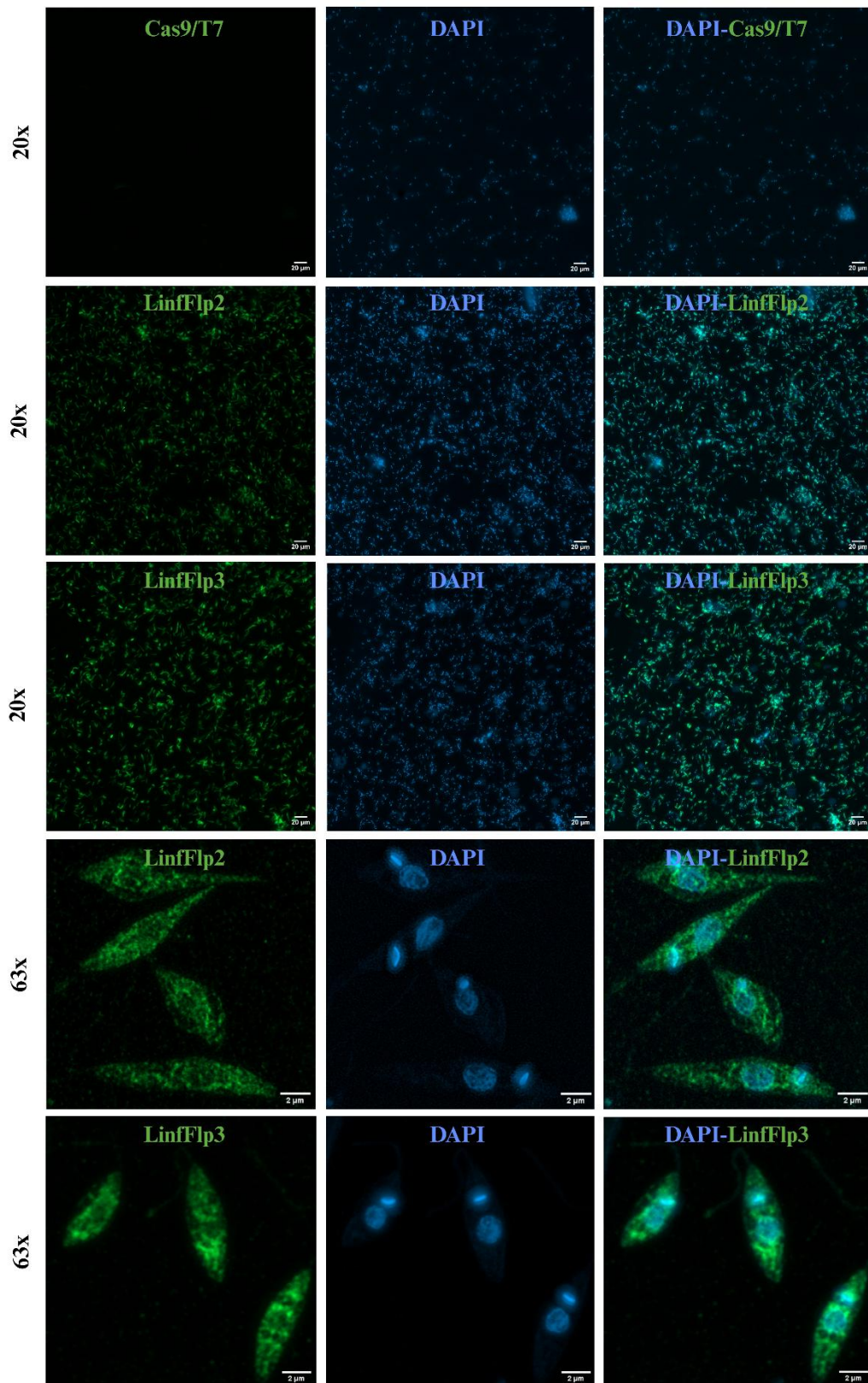


Figura 23. Análise por microscopia confocal da localização subcelular de LinfFlp2 e LinfFlp3. As células foram marcadas com anticorpo detectado com fluoróforo Alexa Fluor 488 (verde) para visualização das proteínas de interesse, enquanto o DNA nuclear e do cinetoplasto foi corado com DAPI (azul). A linhagem Cas9T7 foi utilizada como controle negativo. As imagens foram adquiridas por microscopia confocal, evidenciando a distribuição

predominantemente citoplasmática de LinfFlp2 e LinfFlp3, com discreto enriquecimento perinuclear e padrão pontilhado ao longo da célula.

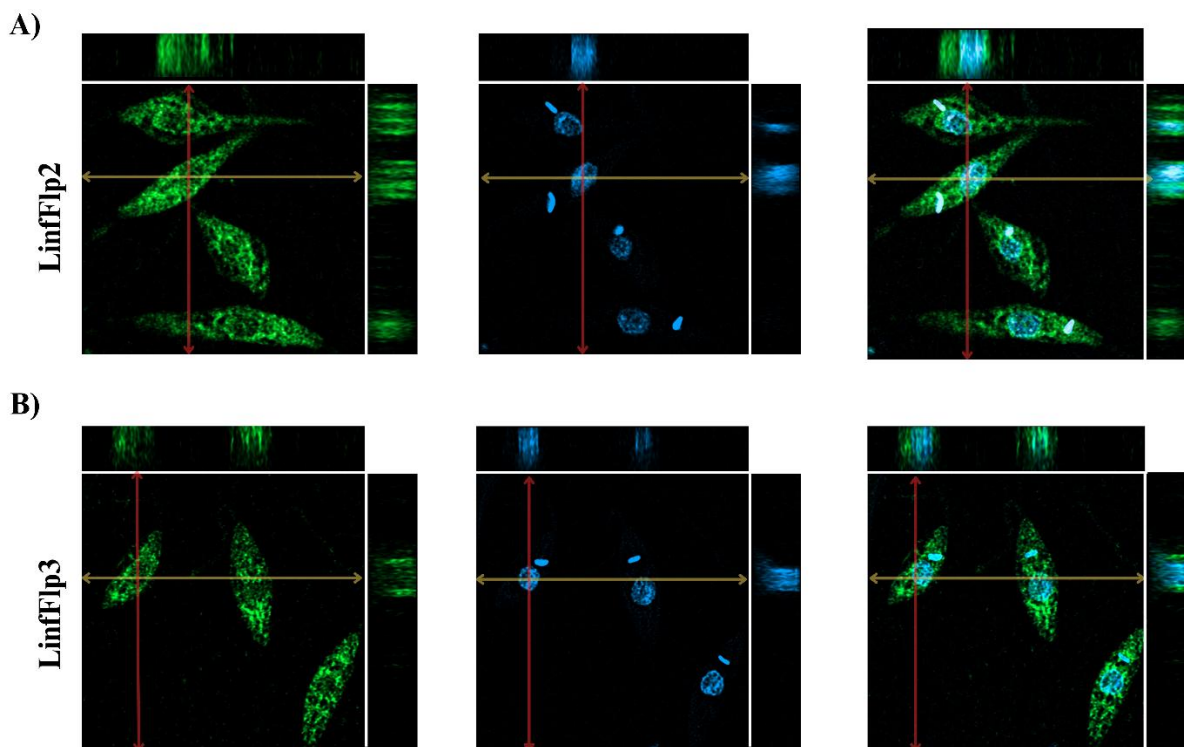


Figura 24. Localização subcelular ao longo dos eixos XYZ por microscopia confocal de fluorescência. Imagens representativas de promastigotas de *L. infantum* expressando (A) LinfFlp2-HA e (B) LinfFlp3-HA. O painel central exibe o plano XY (focal), enquanto os painéis superior e lateral exibem as projeções ortogonais nos eixos XZ e YZ, respectivamente (indicados pelas linhas de corte). O DNA foi corado com DAPI (ciano) e a proteína de interesse está marcada com Alexa Fluor 488 (verde). Escala: 2 μ m.

5. CONCLUSÃO

Este estudo amplia a compreensão do Sistema Ubiquitina-Proteossoma em *Leishmania infantum* por meio da caracterização das proteínas LinfFlp2 e LinfFlp3. A análise dos interactomas revelou redundância funcional parcial entre essas proteínas, com sobreposição de parceiros, mas também indicou funções específicas, especialmente para LinfFlp3. Ensaios funcionais demonstraram que LinfFlp3 é essencial para a viabilidade do parasito, enquanto a presença de um único alelo funcional é suficiente para sustentar suas funções na fase promastigota, sem impacto detectável no crescimento ou no ciclo celular. A identificação de uma interação específica entre LinfFlp3 e uma proteína *Leucine rich repeat* reforça sua seletividade funcional. Em conjunto, os resultados destacam o papel de LinfFlp3 na viabilidade de *L. infantum* e apontam adaptadores de E3 ubiquitina-ligases como potenciais alvos terapêuticos.

6. PROSPECÇÃO DE ARTIGOS CIENTÍFICOS

1- Camila Rolemberg Santana Travaglini Berti de Correia, Caroline Torres*, Ellen Gomes*, Giovana Maffei Rodriguez, **Wesley Klaysson Pereira Regatieri**, Nayore Tamie Takamiya, Luana Aparecida Rogerio, Iran Malavazi, Marcelo Damário Gomes, Jeziel Dener Damasceno, Vitor Luiz da Silva, Marcos Antonio Fernandes de Oliveira, Marcelo Santos da Silva, Alessandro Silva Nascimento, Adriano Cappellazzo Coelho, Sandra Regina Maruyama, Felipe Roberti Teixeira. *Estes autores contribuíram igualmente para este trabalho. “*Functional characterization of Cullin-1-RING ubiquitin ligase (CRL1) complex in Leishmania infantum*”. PLOS Pathogens 20(7): e1012336. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012336> 43. Julho 2024.

2- Ellen Gomes, Camila Rolemberg Santana Travaglini Berti de Correia, Caroline Torres, Mariele Cristina de Carvalho, Taissa de Oliveira de Castro, **Wesley Klaysson Pereira Regatieri**, Nayore Tamie Takamiya, Luana Aparecida, Adriano Cappellazzo Coelho, Juliana Ide Aoki, Sandra Regina Maruyama, Felipe Roberti Teixeira. “*LinfCull1 interaction with LinfSkp1 affects different cellular processes in Leishmania infantum*”. Molecular and Biochemical Parasitology 265: 111712. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2025.111712> . Dezembro 2025.

3- **Submetido** - **Wesley Klaysson Pereira Regatieri**, Camila Rolemberg Santana Travaglini Berti Correia, Felipe Roberti Teixeira. “*Proteomic Dataset of Non-Specific Interactors in Leishmania infantum*”. Data in Brief.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *The Lancet*. 2018;392(10151):951-970. doi:10.1016/S0140-6736(18)31204-2
2. Alvar J, Vélez ID, Bern C, et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLOS ONE*. 2012;7(5):e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671
3. Soares FM de A, Rocha TS, Nascimento ER, de Oliveira GL, Santos MB, Ferreira SR. Human Visceral Leishmaniasis in Brazil in the Past 20 Years: An Epidemiologic Update. *Rev Soc Bras Med Trop*. 58:e0019-2025. doi:10.1590/0037-8682-0019-2025
4. Ready PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol*. 2014;6:147-154. doi:10.2147/CLEP.S44267
5. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(8):604-615. doi:10.1038/nrmicro2608
6. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(1):111-126. doi:10.1128/CMR.19.1.111-126.2006

7. Tomiotto-Pellissier F, Bortoleti BT da S, Assolini JP, et al. Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. *Front Immunol.* 2018;9. doi:10.3389/fimmu.2018.02529
8. Maruyama SR, de Santana AKM, Takamiya NT, et al. Non-Leishmania Parasite in Fatal Visceral Leishmaniasis-Like Disease, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(11):11. doi:10.3201/eid2511.181548
9. Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, et al. Comparative Microsatellite Typing of New World *Leishmania infantum* Reveals Low Heterogeneity among Populations and Its Recent Old World Origin. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(6):e1155. doi:10.1371/journal.pntd.0001155
10. Sundar S, Chakravarty J. An Update on Pharmacotherapy for Leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother.* 2015;16(2):237-252. doi:10.1517/14656566.2015.973850
11. Griensven J van, Dorlo TP, Diro E, Costa C, Burza S. The status of combination therapy for visceral leishmaniasis: an updated review. *Lancet Infect Dis.* 2024;24(1):e36-e46. doi:10.1016/S1473-3099(23)00353-5
12. Gull K. The Cytoskeleton of Trypanosomatid Parasites. *Annu Rev Microbiol.* 1999;53(Volume 53, 1999):629-655. doi:10.1146/annurev.micro.53.1.629
13. Michels PAM, Bringaud F, Herman M, Hannaert V. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1763(12):1463-1477. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.08.019
14. Clayton CE. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J.* 2002;21(8):1881-1888. doi:10.1093/emboj/21.8.1881
15. Benz C, Clayton CE. The F-box protein CFB2 is required for cytokinesis of bloodstream-form *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 2007;156(2):217-224. doi:10.1016/j.molbiopara.2007.08.005
16. Zilberstein D, Shapira M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol.* 1994;48:449-470. doi:10.1146/annurev.mi.48.100194.002313
17. Rosenzweig D, Smith D, Opperdoes F, Stern S, Olafson RW, Zilberstein D. Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. *FASEB J.* 2008;22(2):590-602. doi:10.1096/fj.07-9254com
18. Pohl C, Dikic I. Cellular quality control by the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Science.* 2019;366(6467):818-822. doi:10.1126/science.aax3769
19. Silva-Almeida M, Pereira BAS, Ribeiro-Guimarães ML, Alves CR. Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. *Parasit Vectors.* 2012;5:160. doi:10.1186/1756-3305-5-160
20. Besteiro S, Williams RAM, Coombs GH, Mottram JC. Renovação e diferenciação de proteínas em *Leishmania*. *Int J Parasitol.* 2007;37(10):1063-1075. doi:10.1016/j.ijpara.2007.03.008

21. Silva-López RE da. Proteases de Leishmania: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. *Quím Nova*. 2010;33:1541-1548. doi:<https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000700022>
22. Goldberg AL. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*. 2003;426(6968):895-899. doi:10.1038/nature02263
23. Ciechanover A. Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Cell Death Differ*. 2005;12(9):1178-1190. doi:10.1038/sj.cdd.4401692
24. Chen ZJ, Sun LJ. Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Mol Cell*. 2009;33(3):275-286. doi:10.1016/j.molcel.2009.01.014
25. Bedford L, Lowe J, Dick LR, Mayer RJ, Brownell JE. Ubiquitin-like protein conjugation and the ubiquitin–proteasome system as drug targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(1):1. doi:10.1038/nrd3321
26. Silva-Jardim I, Fátima Horta M, Ramalho-Pinto FJ. The Leishmania chagasi proteasome: role in promastigotes growth and amastigotes survival within murine macrophages. *Acta Trop*. 2004;91(2):2. doi:10.1016/j.actatropica.2004.03.007
27. Nagle A, Biggart A, Be C, et al. Discovery and Characterization of Clinical Candidate LXE408 as a Kinetoplastid-Selective Proteasome Inhibitor for the Treatment of Leishmaniasis. *J Med Chem*. 2020;63(19):19. doi:10.1021/acs.jmedchem.0c00499
28. Damianou A, Burge RJ, Catta-Preta CMC, et al. Essential roles for deubiquitination in Leishmania life cycle progression. *PLOS Pathog*. 2020;16(6):e1008455. doi:10.1371/journal.ppat.1008455
29. Li W, Bengtson MH, Ulbrich A, et al. Genome-Wide and Functional Annotation of Human E3 Ubiquitin Ligases Identifies MULAN, a Mitochondrial E3 that Regulates the Organelle’s Dynamics and Signaling. *PLOS ONE*. 2008;3(1):e1487. doi:10.1371/journal.pone.0001487
30. Correia CRSTB de, Torres C, Gomes E, et al. Functional characterization of Cullin-1-RING ubiquitin ligase (CRL1) complex in Leishmania infantum. *PLOS Pathog*. 2024;20(7):e1012336. doi:10.1371/journal.ppat.1012336
31. Metzger MB, Hristova VA, Weissman AM. HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *J Cell Sci*. 2012;125(3):531-537. doi:10.1242/jcs.091777
32. Wang H, Peng J, Li H, et al. E3 Ubiquitin Ligases: Structures, Biological Functions, Diseases, and Therapy. *MedComm*. 2025;6(12):e70528. doi:10.1002/mco2.70528
33. Nakayama KI, Nakayama K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(5):5. doi:10.1038/nrc1881
34. Schulman BA, Carrano AC, Jeffrey PD, et al. Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1–Skp2 complex. *Nature*. 2000;408(6810):6810. doi:10.1038/35042620

35. Zheng N, Schulman BA, Song L, et al. Structure of the Cull1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature*. 2002;416(6882):6882. doi:10.1038/416703a
36. Kipreos ET, Pagano M. The F-box protein family. *Genome Biol*. 2000;1(5):5. doi:10.1186/gb-2000-1-5-reviews3002
37. Jin J, Cardozo T, Lovering RC, Elledge SJ, Pagano M, Harper JW. Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes Dev*. 2004;18(21):21. doi:10.1101/gad.1255304
38. Skaar J, Pagan J, Pagano M. Mechanisms and function of substrate recruitment by F-box proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14:369-381. doi:10.1038/nrm3582
39. del Pino RC, Zoltner M, Butterfield ER, Field MC. Evolution, composition and functions of cullin E3 ubiquitin ligases in trypanosomes. *Sci Rep*. 2025;16:2285. doi:10.1038/s41598-025-32077-9
40. Gupta I, Aggarwal S, Singh K, Yadav A, Khan S. Ubiquitin Proteasome pathway proteins as potential drug targets in parasite *Trypanosoma cruzi*. *Sci Rep*. 2018;8(1):1. doi:10.1038/s41598-018-26532-z
41. Rodriguez Gini AL, Souza Tada da Cunha P, João EE, et al. TrypPROTACs Unlocking New Therapeutic Strategies for Chagas Disease. *Pharmaceuticals*. 2025;18(6):919. doi:10.3390/ph18060919
42. Clayton C, Shapira M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol Biochem Parasitol*. 2007;156(2):93-101. doi:10.1016/j.molbiopara.2007.07.007
43. Beneke T, Madden R, Makin L, Valli J, Sunter J, Gluenz E. A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids. *R Soc Open Sci*. 4(5):170095. doi:10.1098/rsos.170095
44. de Assis LJ, Bain JM, Liddle C, et al. Nature of β -1,3-Glucan-Exposing Features on *Candida albicans* Cell Wall and Their Modulation. *mBio*. 2022;13(6):6. doi:10.1128/mbio.02605-22
45. Kawahara R, Lima RN, Domingues RR, et al. Deciphering the Role of the ADAM17-Dependent Secretome in Cell Signaling. *J Proteome Res*. 2014;13(4):2080-2093. doi:10.1021/pr401224u
46. Kong AT, Leprevost FV, Avtonomov DM, Mellacheruvu D, Nesvizhskii AI. MSFragger: ultrafast and comprehensive peptide identification in shotgun proteomics. *Nat Methods*. 2017;14(5):513-520. doi:10.1038/nmeth.4256
47. Colasante C, Alibu VP, Kirchberger S, Tjaden J, Clayton C, Voncken F. Characterization and developmentally regulated localization of the mitochondrial carrier protein homologue MCP6 from *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell*. 2006;5(8):1194-1205. doi:10.1128/EC.00096-06

48. Pavani RS, Silva MS da, Fernandes CAH, et al. Replication Protein A Presents Canonical Functions and Is Also Involved in the Differentiation Capacity of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(12):e0005181. doi:10.1371/journal.pntd.0005181
49. Romaniuk MA, Cervini G, Cassola A. Regulation of RNA binding proteins in trypanosomatid protozoan parasites. *World J Biol Chem*. 2016;7(1):146-157. doi:10.4331/wjbc.v7.i1.146
50. Bromley EV, Taylor MC, Wilkinson SR, Kelly JM. The amino terminal domain of a novel WD repeat protein from *Trypanosoma cruzi* contains a non-canonical mitochondrial targeting signal. *Int J Parasitol*. 2004;34(1):63-71. doi:10.1016/j.ijpara.2003.09.004
51. da Costa Lima TD, Moura DMN, Reis CRS, et al. Functional characterization of three leishmania poly(a) binding protein homologues with distinct binding properties to RNA and protein partners. *Eukaryot Cell*. 2010;9(10):1484-1494. doi:10.1128/EC.00148-10
52. De Gaudenzi JG, Noé G, Campo VA, Frasch AC, Cassola A. Gene expression regulation in trypanosomatids. *Essays Biochem*. 2011;51:31-46. doi:10.1042/bse0510031

ANEXOS

**FLP2-HA - CLONE 2
FORWARD**

A)

LinFFLP2-HA-C2-F LinFFLP2-referència	CMMYTGCATGCHGACGGCAA-GACGGGA-TTCTCTGCCTTCAAGATGTGACGACAGACA -----ATGAACGGCAAGACGGGAATCTCTGCCTTCAAGATGTGACGACAGACA *****
LinFFLP2-HA-C2-F LinFFLP2-referència	TCCGGCYCCTTACGATCACTTCCCTTACAGACACTCGTGGCCAGCTTGGCAACGGCG TCCGGCTCTTACGATCACTTCCCTTACAGACACTCGTGGCCAGCTTGGCAACGGCG *****
LinFFLP2-HA-C2-F LinFFLP2-referència	CAAGATGCACGACGGCGAGTTTCTCGACCTGGACGATGACGTCTTCAATTACGTCTGC CAAGATGCACGACGGCGAGTTTCTCGACCTGGACGATGACGTCTTCAATTACGTCTGC *****
LinFFLP2-HA-C2-F LinFFLP2-referència	TCCTACGTGCCGGTCAATGACCTTCTGCGCAACGTGCCGTCCGACGACGACACGCGG TCCTACGTGCCGGTCAATGACCTTCTGCGCAACGTGCCGTCCGACGACGACACGCGG *****
LinFFLP2-HA-C2-F LinFFLP2-referència	CGCCGCTTTCAGCGAACACGCTCTCTGGCAGCAGCTTGGATGCGATACGTCTATT CGCCGCTTTCAGCGAACACGCTCTCTGGCAGCAGCTTGGATGCGATACGTCTATT *****
LinFFLP2-HA-C2-F LinFFLP2-referència	TTTTTCAACGCCTTGATTCAGCCACAGCGGACGCCGCTGGCGTCTGCGCGGCG TTTTTCAACGCCTTGATTCAGCCACAGCGGACGCCGCTGGCGTCTGCGCGGCG *****
LinFFLP2-HA-C2-F LinFFLP2-referència	GCACCGACTCGTGGACGATGGGAGTGGCGCCGCGGACGCGATGGCATGCTTACACC GCACCGACTCGTGGACGATGGGAGTGGCGCCGCGGACGCGATGGCATGCTTACACC *****
LinFFLP2-HA-C2-F LinFFLP2-referència	ACCGCTACAACGCCACCCAGTCATGACAGCTCTGGCACCTTATCACTTTCACACTCG ACCGCTACAACGCCACCCAGTCATGACAGCTCTGGCACCTTATCACTTTCACACTCG *****
LinFFLP2-HA-C2-F LinFFLP2-referència	GCAGAGGCGAAGCGCACGCTGGTGCAGCTCGAAGAGTGCACATTTGCGCGAAGACATC GCAGAGGCGAAGCGCACGCTGGTGCAGCTCGAAGAGTGCACATTTGCGCGAAGACATC *****
LinFFLP2-HA-C2-F LinFFLP2-referència	GCCGACCCGGCAGCGGGGTGTACCCACCTCGCGTGTGCTCCAGCGAGTTAAGAAGC GCCGACCCGGCAGCGGGGTGTACCCACCTCGCGTGTGCTCCAGCGAGTTAAGAAGC *****
LinFFLP2-HA-C2-F LinFFLP2-referència	GCGGAGTCCAAGCACAGCTGCTGAGCTTCCGCCAGGCGTGCCTACACAGAGGTTGGCG GCGGAGTCCAAGCACAGCTGCTGAGCTTCCGCCAGGCGTGCCTACACAGAGGTTGGCG *****
LinFFLP2-HA-C2-F LinFFLP2-referència	CGGAATCTCAGTACATGACAGCCCGTCTCTCCCTCCCGCTCCCGCCGCCACG CGGAATCTCAGTACATGACAGCCCGTCTCTCCCTCCCGCTCCCGCCGCCACG *****
LinFFLP2-HA-C2-F LinFFLP2-referència	GCC-GACCTGAAGGGGTGCCACAGGGCGAAACTTCCGCGACGGCAGCACCTTGATGTG GCCGACCTGAAGGGGTGCCACAGGGCGAAACTTCCGCGACGGCAGCACCTTGATGTG ** *****
LinFFLP2-HA-C2-F LinFFLP2-referència	CTTAACAGCAGCAGCGGAGGGG-ATCGGCTACA-CGGGATTGCACTTCTCTCTCGCA CTTAACAGCAGCAGCGGAGGGG-ATCGGCTACA-CGGGATTGCACTTCTCTCTCGCA *****
LinFFLP2-HA-C2-F LinFFLP2-referència	----CGGTACGG--CGCGCTT-CACGAC--GGCTTGGGG--CAC--ACGACGTGAA GCCACCGTCAACGGCGCGCTTTACGACCGGCTTGGGGGCGCAACGACGTGAA *****
LinFFLP2-HA-C2-F LinFFLP2-referència	-GAGAGT-CATCGGAGCSGC----ARAGGGGCGGCTMMGGAMC--GAAGC--GCCA-G AGAGAGTTATCGGAAAGCGCGCAGAGGGGCGGCTCCACGACACGAAAGCGGCAAG *****
LinFFLP2-HA-C2-F LinFFLP2-referència	SGGCA----TCCTGRATC-GTCTGYGCTGYACGA-----GCYKAMTTGCCGCM CGCGAAATCCCCTGAGTCTGCTGCTGCTTGCAGCGGACGCGGCTCCGCGGCA ** *****
LinFFLP2-HA-C2-F LinFFLP2-referència	AGSGGGGG----- GCGCGGTTCCGCGGATGAGCTGGATGACGACCAAGAGACTTGTCAAGGTTCTTCTC ***

**FLP2-HA - CLONE 2
REVERSE**

B)

LinFFLP2-referència LinFFLP2-HA-C2-R	CTCACCATCGCCGTGTGGAGCCGTATCCTCAGCCCCACAGGACACAGCGC-TGAGTGTGC -----AMRGCCTC--CACCAGAGAACMCAGCGCTGAGTT--- ** *****
LinFFLP2-referència LinFFLP2-HA-C2-R	CCTCTTACTCGTGCGA-TGTGCAACGTTTCCGCGCATGTTACAGAAAATGATGTTCA SCYCTTACTCGCTGCAATGKGA-CGTGCG---GCATGTTACAGAAA-TGATKTCA *****
LinFFLP2-referència LinFFLP2-HA-C2-R	CGCCTGGGGTGTGCCATCGTACGCTGACGGGAAAGATGTCGGAGCGTCCGCTACT CSCT--GGGTGCTGC-ATCGCTGACGCTGCAGGGAA-GATKTCG-AGCGCTCG-GTACT * *****
LinFFLP2-referència LinFFLP2-HA-C2-R	GTCCTCCGCTGCTGCTCGGCATACGACTCGAGTCGTTATCTGCTGATGCCGACGGTA GCTCCC-GTCTGCTGCTCGGCATACGACTCGAGTCGTTWCTGCTGATGCCGACGGTA *****
LinFFLP2-referència LinFFLP2-HA-C2-R	ATGCCGCGACGACGCCGGGTGCTGCTCCGCTCGAGGGTGACAAACGGTGGACAGTC ATGCCGCGACGACGCCGGGTGCTGCTCCGCTCGAGGGTGACAAACGGTGGACAGTC *****
LinFFLP2-referència LinFFLP2-HA-C2-R	GGCAAATCTACGACTCTTCTGGACCGGCTTGGCGTGTGGAGTGGACTTGGCCGA GGCAAATCTACGACTCTTCTGGACCGGCTTGGCGTGTGGAGTGGACTTGGCCGA *****
LinFFLP2-referència LinFFLP2-HA-C2-R	CCATCTCAGGTCGAACATGGTGCCTGCGCATCGGCTCGGCTGCGGTCGACTTTC CCATCTCAGGTCGAACATGGTGCCTGCGCATCGGCTCGGCTCGGCTCGGCTCGGTC *****
LinFFLP2-referència LinFFLP2-HA-C2-R	CAATGGGGTCTGTGGAATGTGGTGTGTTGCGCTCAGGATTGGCCCTCTATTCTTA CAATGGGGTCTGTGGAATGTGGTGTGTTGCGCTCAGGATTGGCCCTCTATTCTTA *****
LinFFLP2-referència LinFFLP2-HA-C2-R	AAGAGACCCGGCACTCTTCACTTCAACTACGCGCAAGACATTACCGACGCTGTGGCGG AAGAGACCCGGCACTCTTCACTTCAACTACGCGCAAGACATTACCGACGCTGTGGCGG *****
LinFFLP2-referència LinFFLP2-HA-C2-R	ACGAGTTCGGTGAAGTCTGCTGCTGCGCTCGGCTCGGCTCGGCTCGGCTCGGCTCGG ACGAGTTCGGTGAAGTCTGCTGCTGCGCTCGGCTCGGCTCGGCTCGGCTCGGCTCGG *****
LinFFLP2-referència LinFFLP2-HA-C2-R	ACTCCACAGCATGGCGAACCCGCTCGATGACAGAGGGGTAATGTGGGGGACACGCGG ACTCCACAGCATGGCGAACCCGCTCGATGACAGAGGGGTAATGTGGGGGACACGCGG *****
LinFFLP2-referència LinFFLP2-HA-C2-R	TATCCGCAATGGCACCCGAGTGGGGAGGGGAGGTCGTACGAACCGCCGCAACATC TATCCGCAATGGCACCCGAGTGGGGAGGGGAGGTCGTACGAACCGCCGCAACATC *****
LinFFLP2-referència LinFFLP2-HA-C2-R	AAGAGACCCGGAAGTGCAGAACAGCGGTGAATGAAGTGGATCCTGCACATCAGACA AAGAGACCCGGAAGTGCAGAACAGCGGTGAATGAAGTGGATCCTGCACATCAGACA *****
LinFFLP2-referència LinFFLP2-HA-C2-R	CCTCTCCGACCCGACACTCTCACGGGATCACAACATGGTGTGGGACTGGACTCCG CCTCTCCGACCCGACACTCTCACGGGATCACAACATGGTGTGGGACTGGACTCCG *****
LinFFLP2-referència LinFFLP2-HA-C2-R	AGTTTAGCAGTACGAGGCTACTGGTCACTTCCCGGACGACGCTCTCTCCGATACC AGTTTAGCAGTACGAGGCTACTGGTCACTTCCCGGACGACGCTCTCTCCGATACC *****
LinFFLP2-referència LinFFLP2-HA-C2-R	AGTGA----- AGTCTAGACTCGAGGGTGGATACCATACGACGTACCRGATTACGCTAAGCGGCGCCCT **

FLP3-HA - CLONE 1
FORWARD

C

```

LinffLP3-HA-C2-F      ACATACACTCGAAAYTGCATGATGAGCGGCAGTGGTGCGGTGAATCTCCACCTTGGCG
LinffLP3-referència  -----ATGAGCGGCAGTGGTGCGGTGAATCTCCACCTTGGCG
*****

LinffLP3-HA-C2-F      AAGCCCGTCTGGATTGTGTCSCAGGTACGCTGCATCCCACTCGACCAGTGGGTACCGGAT
LinffLP3-referència  AAGCCCGTCTGGATTGTGTCSCAGGTACGCTGCATCCCACTCGACCAGTGGGTACCGGAT
*****

LinffLP3-HA-C2-F      GCACACGTGGTGAACGTGATGGCACCGGGCTGCAGCAACAGCTTTTCTCTTTAACCAGC
LinffLP3-referència  GCACACGTGGTGAACGTGATGGCACCGGGCTGCAGCAACAGCTTTTCTCTTTAACCAGC
*****

LinffLP3-HA-C2-F      AAGCATCACTGCCGTATGTGCGGGCGCGTCTTGCTCTCGTGTGCAACAACCTCGTG
LinffLP3-referència  AAGCATCACTGCCGTATGTGCGGGCGCGTCTTGCTCTCGTGTGCAACAACCTCGTG
*****

LinffLP3-HA-C2-F      TACATACCGGCGCCGTTGTGAACAAGGCGAATAGCTCGACCGAGGGTACGGCGGCGGGC
LinffLP3-referència  TACATACCGGCGCCGTTGTGAACAAGGCGAATAGCTCGACCGAGGGTACGGCGGCGGGC
*****

LinffLP3-HA-C2-F      AGCTATTCCGCAACCGCAACACGTCCGTGAGCTCGTGTACTCCGAGCCGAGCAGCAG
LinffLP3-referència  AGCTATTCCGCAACCGCAACACGTCCGTGAGCTCGTGTACTCCGAGCCGAGCAGCAG
*****

LinffLP3-HA-C2-F      TTTAACCGCGCTGTGCGAACGACGCGAGTGCCTGCGCAACGGGATGCGGCGAGGACCA
LinffLP3-referència  TTTAACCGCGCTGTGCGAACGACGCGAGTGCCTGCGCAACGGGATGCGGCGAGGACCA
*****

LinffLP3-HA-C2-F      CAGGCCCCGACGCGAGGGAYTYKATGTGTCCTCCGCTCCAGCGCTACACTGTTCCCC
LinffLP3-referència  CAGGCCCCGACGCGAGGGAYTYKATGTGTCCTCCGCTCCAGCGCTACACTGTTCCCC
*****

LinffLP3-HA-C2-F      GGCCCTGCTGCTGTGTCAGCGATGGAACGGTACCTACCGTAAACGCGCTACCTCC
LinffLP3-referència  GGCCCTGCTGCTGTGTCAGCGATGGAACGGTACCTACCGTAAACGCGCTACCTCC
*****

LinffLP3-HA-C2-F      CCGTCGGCGGTGACGGCGTGCCTCATCACTGCTCCGTCACCCAAGCCGCGGTGCCA
LinffLP3-referència  CCGTCGGCGGTGACGGCGTGCCTCATCACTGCTCCGTCACCCAAGCCGCGGTGCCA
*****

LinffLP3-HA-C2-F      TGCCGTGTGTGTCAGCTGCTCTACGAGGTCCAGTGGTGGTGTACTCGCAAGAA
LinffLP3-referència  TGCCGTGTGTGTCAGCTGCTCTACGAGGTCCAGTGGTGGTGTACTCGCAAGAA
*****

LinffLP3-HA-C2-F      AACGGCGAGCCGCCGCCGAGCCGCGGTGAGCTCAAGATGATCCAGCGCTCTCTCTC
LinffLP3-referència  AACGGCGAGCCGCCGCCGAGCCGCGGTGAGCTCAAGATGATCCAGCGCTCTCTCTC
*****

LinffLP3-HA-C2-F      GTCAACGTATGAGCTTCTGACSTGCGCGACTTGGCGAATGTGCTGCTCGGCG
LinffLP3-referència  GTCAACGTATGAGCTTCTGACSTGCGCGACTTGGCGAATGTGCTGCTCGGCG
*****

LinffLP3-HA-C2-F      GACTTCTACTTATGTCGGAGAACATCATCTGGTACCAGTACAATATGACSCGGTG
LinffLP3-referència  GACTTCTACTTATGTCGGAGAACATCATCTGGTACCAGTACAATATGACSCGGTG
*****

LinffLP3-HA-C2-F      GGTTCAGGAGCCGAGCTGCCGCGACTGTCGCTCAACTCGCGTGTGCTGCGSSTYTCG
LinffLP3-referència  GGTTCAGGAGCCGAGCTGCCGCGACTGTCGCTCAACTCGCGTGTGCTGCGSSTYTCG
*****

LinffLP3-HA-C2-F      AATGCAGCAGCAGCGAGGACAGCTGGTAMAC--TATTCTCGGCMAGGGGGCCGCCAG
LinffLP3-referència  AATGCAGCAGCAGCGAGGACAGCTGGTAMAC--TATTCTCGGCMAGGGGGCCGCCAG
*****

LinffLP3-HA-C2-F      CTCTTTGATAGAMGAAGTCTTCTCAGAGTGCCTCGTGAWAWTYMARAGAWGT----
LinffLP3-referència  CTCTTTGATAGACATGTTCTC--GAGTGCCTCGGTTGA--TTCAAGATGCCACCACG
*****

```

D)

FLP3-HA - CLONE 2
REVERSE

```

LinffLP3-referència  GCGATTGGTCTCTGCTATGACCCGTCGCCGAAAGTGACGCTGGTGCAGGCGCAGATATT
LinffLP3-HA-C2-R    -----CAGGGC--SGCCMAGAATATAW
*****

LinffLP3-referència  ATGATGGGGCTCG-AGAGCGCTCTGGGCCCCGAGCGGTAGTGATCTGCGGACTGATCGG
LinffLP3-HA-C2-R    WTRWRITGGGCTCGSAGAGCGCTCCGGGCC--GCAGTCG--TAKGATCTGCGGACTGATCGG
*****

LinffLP3-referència  ACAGCCACATTATACCTCGAGCTCGAGCAGCGCACCCCTTATCACACAGGGCAGGCC
LinffLP3-HA-C2-R    ACAGCCMCAT-ATAC-TCGAGCTCGAGCAGCGCACCC--TCATCAC-ACAGGGCAGGCC
*****

LinffLP3-referència  CGCTCGCTTCCCCTGTGGTGTGTCAGCAACTGCGTTGAACCTCTCAGCGCCCCGAA
LinffLP3-HA-C2-R    -GCTCGCTTCC--GCTGTG-TGCTCGCAGCAACTGCGTTGAACCTCTCAGCGCCCC-GAA
*****

LinffLP3-referència  GAAGGAGGACGAATGCTCTCACTCGATGCTGGTCCGCTCTGCTGAGGCTGAGGCTCGGG
LinffLP3-HA-C2-R    GAAGGAGGACGAATGCTCTCACTCGATGCTGGTCCGCTCTGCTGAGGCTGAGGCTCGGG
*****

LinffLP3-referència  TGGCGTTCAGGCGAGTCGAGGGTGCAGCCCAATGTGCGGCTGCCAACGGTTGTAA
LinffLP3-HA-C2-R    TGGCGTTCAGGCGAGTCGAGGGTGCAGGGTGCAGCCCAATGTGCGGCTGCCAACGGTTGTAA
*****

LinffLP3-referència  CACGCCACCTCAAGCCAGCAGCAGCCCTGAGGTACCGGCTCAGGTTGCCCGGCTTGT
LinffLP3-HA-C2-R    CACGCCACCTCAAGCCAGCAGCAGCCCTGAGGTACCGGCTCAGGTTGCCCGGCTTGT
*****

LinffLP3-referència  TGCAGAGAATGGTGTACGAGAGCTGTGACGACTGCAGGATGACGCCGCGGTATCGCC
LinffLP3-HA-C2-R    TGCAGAGAATGGTGTACGAGAGCTGTGACGACTGCAGGATGACGCCGCGGTATCGCC
*****

LinffLP3-referència  GATTCCATCACCTACGCGCCGCGTTCACCATCGCTCTCCGACAGATAGCGTCTCGA
LinffLP3-HA-C2-R    GATTCCATCACCTACGCGCCGCGTTCACCATCGCTCTCCGACAGATAGCGTCTCGA
*****

LinffLP3-referència  AGTGTGCGTGCAGGACGCGTGGGATTACCGTTGAGGCGCACTCATCCATCCATTGTCC
LinffLP3-HA-C2-R    AGTGTGCGTGCAGGACGCGTGGGATTACCGTTGAGGCGCACTCATCCATCCATTGTCC
*****

LinffLP3-referència  GCTGTGCACCCACCCGTTGTTGAGGCTCTCGTGCAGTCTGTGCTGGACCTTTTGT
LinffLP3-HA-C2-R    GCTGTGCACCCACCCGTTGTTGAGGCTCTCGTGCAGTCTGTGCTGGACCTTTTGT
*****

LinffLP3-referència  GGAGGCGAGGTTGGCAGCAGCAGCACAATATCGAGATCAGCGGGGCTCACGACGCA
LinffLP3-HA-C2-R    GGAGGCGAGGTTGGCAGCAGCAGCACAATATCGAGATCAGCGGGGCTCACGACGCA
*****

LinffLP3-referència  TGGCGGCGCAGCGCCGCAAAAGCTTCCGACGTGTTGTCGAGCTCTGAGCGCTGG
LinffLP3-HA-C2-R    TGGCGGCGCAGCGCCGCAAAAGCTTCCGACGTGTTGTCGAGCTCTGAGCGCTGG
*****

LinffLP3-referència  CAGTGCAGCAGCAGCGATGCGAGTGCCTTACGCGCCGCTCCGACGCATCGCG
LinffLP3-HA-C2-R    CAGTGCAGCAGCAGCGATGCGAGTGCCTTACGCGCCGCTCCGACGCATCGCG
*****

LinffLP3-referència  GGCAATTATGGAGGACCTGCTGAACCTGACGATGACGCCCTGTGCACTGGACATCTTGT
LinffLP3-HA-C2-R    GGCAATTATGGAGGACCTGCTGAACCTGACGATGACGCCCTGTGCACTGGACATCTTGT
*****

LinffLP3-referència  GGATCGAAAGTAG-----
LinffLP3-HA-C2-R    GGATCGAAAGTAG-----
*****

```

FLP3-HA - CLONE 2

FORWARD

E)	LinFLP3-HA-C2-F LinFLP3-referència	CYAYCTGATGTATGAGCGGAGTGGTGGTGA-TCCTCCACCTTGGCGAAGCCGTC -----ATGAGCGGACGTGGTGGTGAATCCTCCACCTTGGCGAAGCCGTC *****
	LinFLP3-HA-C2-F LinFLP3-referència	CTGGATTGTCGAGGTACGCTGCATCCCCTCGACAGTGGGTACGGATGCMCACGTG CTGGATTGTCGAGGTACGCTGCATCCCCTCGACAGTGGGTACGGATGACACAGTG *****
	LinFLP3-HA-C2-F LinFLP3-referència	GTGAAGTGCATGGCAGGGCTGCAGCAACAGCTTTCTCTCTTAACCGCAAGCATCAC GTGAAGTGCATGGCAGGGCTGCAGCAACAGCTTTCTCTCTTAACCGCAAGCATCAC *****
	LinFLP3-HA-C2-F LinFLP3-referència	TGCCGTATGTGCGGGCGCTTCTGTCTCTGTGCTGCAACAACTCGTGTACATACCG TGCCGTATGTGCGGGCGCTTCTGTCTCTGTGCTGCAACAACTCGTGTACATACCG *****
	LinFLP3-HA-C2-F LinFLP3-referència	GCCGCCGTTGTGAACAAGGCAATAGCTCGACGAGGGTACGGCGGGGAGCATTCG GCCGCCGTTGTGAACAAGGCAATAGCTCGACGAGGGTACGGCGGGGAGCATTCG *****
	LinFLP3-HA-C2-F LinFLP3-referència	GCAACCGCAACACGCTCGGTGAGCTCCGTTTACTCCGAGCGCAGCAAGTTAACGCG GCAACCGCAACACGCTCGGTGAGCTCCGTTTACTCCGAGCGCAGCAAGTTAACGCG *****
	LinFLP3-HA-C2-F LinFLP3-referència	GCGTGTGCAACGACGGCAGTGCCTGCCAAACGGGATGCGCGAGGACACAGGCCCC GCGTGTGCAACGACGGCAGTGCCTGCCAAACGGGATGCGCGAGGACACAGGCCCC *****
	LinFLP3-HA-C2-F LinFLP3-referència	GCAGCGAGGGACTCGATGTGTCCTCGCTCCAGCGCTACACTGTTCCCGGCCCTCTG GCAGCGAGGGACTCGATGTGTCCTCGCTCCAGCGCTACACTGTTCCCGGCCCTCTG *****
	LinFLP3-HA-C2-F LinFLP3-referència	CCTGTCTGACGAGTGAACAGGTCACCTACCCTTAACGCGCTCACCTCCCGCTCGGG CCTGTCTGACGAGTGAACAGGTCACCTACCCTTAACGCGCTCACCTCCCGCTCGGG *****
	LinFLP3-HA-C2-F LinFLP3-referència	GTGACGGCTGCGTCACTGTCTCCGTCACCAAGCGCGGTGCCATGCCGTGTG GTGACGGCTGCGTCACTGTCTCCGTCACCAAGCGCGGTGCCATGCCGTGTG *****
	LinFLP3-HA-C2-F LinFLP3-referència	TGTGCCAGTGTCTTACGAGTCCAGCTGGTGTCTACTCGCAAGAAACGCGGAG TGTGCCAGTGTCTTACGAGTCCAGCTGGTGTCTACTCGCAAGAAACGCGGAG *****
	LinFLP3-HA-C2-F LinFLP3-referència	CCGCGCCGCCGAGCGGGTGAAGTCAAGATGATCAGCGCTCTCTCGTCAAGGTC CCGCGCCGCCGAGCGGGTGAAGTCAAGATGATCAGCGCTCTCTCGTCAAGGTC *****
	LinFLP3-HA-C2-F LinFLP3-referència	ATGAGTCTCTGACGCTGCGGACTTGGCGAATGTGCTGTCTCGCGGACTTCTAC ATGAGTCTCTGACGCTGCGGACTTGGCGAATGTGCTGTCTCGCGGACTTCTAC *****
	LinFLP3-HA-C2-F LinFLP3-referència	TTCATGTCCCAGACAAATCATCTGGTAC-AGTACAATATGACGCGTGGGTTCAAGG TTCATGTCCCAGACAAATCATCTGGTACAGTACAATATGACGCGTGGG-TTCAAGG *****
	LinFLP3-HA-C2-F LinFLP3-referència	GGC-GAGCTGCCGACTGTCTGCTCAACTCGCTGCTGCG-CTCTCGA-TGCAAGCA GGCAGCTGCCGACTGTCTGCTCAACTCGCTGCTGCG-CTCTCGA-TGCAAGCA *** *****
	LinFLP3-HA-C2-F LinFLP3-referència	GCAAGCGGGCCAGCTG-TACACTA--TCCTCGGCAAGTGGGTCG-CAGCTCT-GAT GCAAGCGGGCCAGCTGGTACACTATTCCTCGGCAAGTGGGTCG-CAGCTCT-GAT *****
	LinFLP3-HA-C2-F LinFLP3-referència	AGACGAC-TGTTCTCGAGTGC-TCGGGAATCCAGAATGCMCMGCTTCTTGAAGGCGA AGACGACATGTTCTCGAGTGCAGGTTCAAGATGCAACACGCTCTCGAGAGCGA *****
	LinFLP3-HA-C2-F LinFLP3-referència	GGC--TTAAG-GCGAMTCTCTG----- GGCGCTAAGCGGCTCATCTGTTGATGCGGCTACAACACAGTTCCTGACTT *** *****

FLP3-HA - CLONE 2

REVERSE

F)	LinFLP3-referència LinFLP3-HA-C2-R	GCGATTGGTCTCTGCTATGACCCGTCGCCGAAAGTGACGCTGGTGCAGCGGCGAGATATT -----GCAAGTANTATTAAT *** * ** *
	LinFLP3-referència LinFLP3-HA-C2-R	ATGATGGGCTCGAGAGCGCTCTGGGCCGAGCGGTAGTGATGCGGACTGATGCGA GWATGGAGGCTCGAGARGGCTTAGCGCSCAGC--GTAKKA--TCGCGGACTGATGCGA * ***** ** * ** * ** * ** * *****
	LinFLP3-referència LinFLP3-HA-C2-R	CAGCCACATTATACCTCGAGCTCGAGCAGCGACCCCTTATCACCACAGGGCAGGCC CAGC---ACMATATCTCGAGCTCGAGCAGCGCAC--CTTACACACAGG-CAGACCC- **** * ** ***** ***** ** * ** *
	LinFLP3-referència LinFLP3-HA-C2-R	GCTCGCTTCCCGCTGTGGTGTCTGCAGCAACTGCGTGAACCTCTCAGCGCCCCGAAG GCTCGCTTCC--GCTGTGGTGTCTGCAGCAACTGCGTGAACCTCTCAGCGCCCC--GAAG ***** ***** ***** ***** *****
	LinFLP3-referència LinFLP3-HA-C2-R	AAGGAGGACGAATGCTCTCACTCGATGCTGGTGGTCTGCTGAGGCTGAGGCTGCGGGT AAGGAGGACGAATGCTCTCACTCGATGCTGGTGGTCTGCTGAGGCTGAGGCTGCGGGT *****
	LinFLP3-referència LinFLP3-HA-C2-R	GGCGTTGCAGGCGAGTGCAGGGTCCCGCCCAATGTGCGCGCTGCCAACGGTTGTAAC G-CGTTGCAGGCGAGTGCAGGGTCCCGCCCAATGTGCGCGCTGCCAACGGTTGTAAC * *****
	LinFLP3-referència LinFLP3-HA-C2-R	ACGCCACTCAAGCAGCAGCAGCCCTGAGGTACCGGCTCAGTTGCCGCGTGT ACGCCACTCAAGCAGCAGCAGCCCTGAGGTACCGGCTCAGTTGCCGCGTGT *****
	LinFLP3-referència LinFLP3-HA-C2-R	GCAGAGAATGGTGTACGAGAGTGTGACGGACTGCAGGATGACCGCGGTATCGCCG GCAGAGAATGGTGTACGAGAGTGTGACGGACTGCAGGATGACCGCGGTATCGCCG *****
	LinFLP3-referència LinFLP3-HA-C2-R	ATTCATCACCTACGCCCGCGTTCACCATCGCTCTCCGAGAGTACGCTGTGCA ATTCATCACCTACGCCCGCGTTCACCATCGCTCTCCGAGAGTACGCTGTGCA *****
	LinFLP3-referència LinFLP3-HA-C2-R	GTGTGGTGCAGGACGCGTGGGATTACCGTTGAGGCCACTCATCATCATTTGTCG GTGTGGTGCAGGACGCGTGGGATTACCGTTGAGGCCACTCATCATCATTTGTCG *****
	LinFLP3-referència LinFLP3-HA-C2-R	CTGCTGACCCACCCCGTTGTTGAGGCTCTGTCGAGTGTGTGACCTTTTAGTG CTGCTGACCCACCCCGTTGTTMRAGRCTCTGTCGAGTGTGTGCTGGACTTTTAGTG *****
	LinFLP3-referència LinFLP3-HA-C2-R	GAGGCGACGGTGGCAGCAGCAGCACCATATCGGAGTACGCGGGGCTCAGCAGCAT GAGGCGACGGTGGCAGCAGCAGCACCATATCGGAGTACGCGGGGCTCAGCAGCAT *****
	LinFLP3-referència LinFLP3-HA-C2-R	GGCGGCGCAGCGGCGCAAAGCTTTCCGACGTTGTTCCGAGCTCTCTGAGCTGGC GGCGGCGCAGCGGCGCAAAGCTTTCCGACGTTGTTCCGAGCTCTCTGAGCTGGC *****
	LinFLP3-referència LinFLP3-HA-C2-R	AGTGGCGCAGCGAGCGAGTGCAGTGCCTTACGCGCCCGTCCGACGATCGCGG AGTGGCGCAGCGAGCGAGTGCAGTGCCTTACGCGCCCGTCCGACGATCGCGG *****
	LinFLP3-referència LinFLP3-HA-C2-R	GCAATTATGGAGGACTGCTGAACCTGACGATGACGCGCTGTGACTGGACATCTTGTG GCAATTATGGAGGACTGCTGAACCTGACGATGACGCGCTGTGACTGGACATCTTGTG *****
	LinFLP3-referència LinFLP3-HA-C2-R	GATCGAAAGTAG----- GATCGAAAGTAGACTGAGGGTGGATACCCATACGACGWACCAGATTACGCTAAGCGG *****

Anexo 1. As análises correspondem ao alinhamento múltiplo das sequências obtidas por sequenciamento Sanger em relação à sequência de referência dos respectivos genes. **(A)** e **(B)** representam, respectivamente, os alinhamentos das leituras *forward* e *reverse* do clone 2 de LinfFLP2-HA. **(C)** e **(D)** correspondem aos alinhamentos *forward* e *reverse* do clone 1 de LinfFLP3-HA. Por fim, **(E)** e **(F)** apresentam os alinhamentos *forward* e *reverse* do clone 2 de LinfFLP3-HA.

**REPA-MYC- CLONE 2
FORWARD**

A)

```

LinFREPA-myc-C1-F      CAACWRCGACATGGAGCAGAGTGATCTCAGAGGAGGACCTGATGCAAGCAGCGGGGCGAG
LinFREPA-referência    -----ATGCAGCAGCGGGGCGAG
                        *****

LinFREPA-myc-C1-F      CCACCCATCCAGCCATCGACTCCCACACCGTTTCTCGGTGGAAGTGTGGATTCCG
LinFREPA-referência    CCACAGATCCAGCCATCGACTCCCACACCGTTTCTCGGTGGAAGTGTGGATTCCG
                        *****

LinFREPA-myc-C1-F      GGCCCGTGTGACAGACAAGACGGACATCCGTACCTGGAACAAGCCGACGTCGAGGGAAA
LinFREPA-referência    GGCCCGTGTGACAGACAAGACGGACATCCGTACCTGGAACAAGCCGACGTCGAGGGAAA
                        *****

LinFREPA-myc-C1-F      GCTCTTCTCCTTACCCTCATTGACGAGTCTGCCGCGATTGGGCAACGGTCTTCAACGA
LinFREPA-referência    GCTCTTCTCCTTACCCTCATTGACGAGTCTGCCGCGATTGGGCAACGGTCTTCAACGA
                        *****

LinFREPA-myc-C1-F      CGCCGTCGACACCTTCGAGCCGCTCATCTCAATGGACAGGTATACTATTTCAGCGGTGG
LinFREPA-referência    CGCCGTCGACACCTTCGAGCCGCTCATCTCAATGGACAGGTATACTATTTCAGCGGTGG
                        *****

LinFREPA-myc-C1-F      CCAGGTGAAGAAATGCGAACCGGCTTTCAGCAACGTGAACAATGACTACGAGCTCACGTT
LinFREPA-referência    CCAGGTGAAGAAATGCGAACCGGCTTTCAGCAACGTGAACAATGACTACGAGCTCACGTT
                        *****

LinFREPA-myc-C1-F      TGACCCGAGCTCGGAGATTATGCTGGCCGCGCAGGACACATCAACAGCGCGCTGCCGAT
LinFREPA-referência    TGACCCGAGCTCGGAGATTATGCTGGCCGCGCAGGACACATCAACAGCGCGCTGCCGAT
                        *****

LinFREPA-myc-C1-F      GCMKYGCTACAACCTTGTGCCGATCGAGCTTCTGAAGCAGCGCAGGTCGGTTCCGCTCGT
LinFREPA-referência    GCAGCGCTACAACCTTGTGCCGATCGAGCTTCTGAAGCAGCGCAGGTCGGTTCCGCTCGT
                        *****

LinFREPA-myc-C1-F      CGACGTGCTTGGCGCTGCTCAAGTGGACGAAGTGTCTCCATCACGAGAAGTCGAC
LinFREPA-referência    CGACGTGCTTGGCGCTGCTCAAGTGGACGAAGTGTCTCCATCACGAGAAGTCGAC
                        *****

LinFREPA-myc-C1-F      GGGCCGTGAGCTGGTGAAGCGAAACGTCAAGATGGGCGACATGACGGCGCTGTGGAGGT
LinFREPA-referência    GGGCCGTGAGCTGGTGAAGCGAAACGTCAAGATGGGCGACATGACGGCGCTGTGGAGGT
                        *****

LinFREPA-myc-C1-F      CACCTTCTGGAAGATGAGGCAAAAGCGTGGTGTCTACCCAGTCGGCACCGCTTGTGGCGCT
LinFREPA-referência    CACCTTCTGGAAGATGAGGCAAAAGCGTGGTGTCTACCCAGTCGGCACCGCTTGTGGCGCT
                        *****

LinFREPA-myc-C1-F      GCGGCAGCTGAAGGTTGGCAGTTTCGACGGTGTGACCTCTCATCCACTTATCAGACCAA
LinFREPA-referência    GCGGCAGCTGAAGGTTGGCAGTTTCGACGGTGTGACCTCTCATCCACTTATCAGACCAA
                        *****

LinFREPA-myc-C1-F      GATCGACATCAACCCACAGACTGCGGAGCTCAAGAAGCTGCGCAGCTG-TATGTGAC
LinFREPA-referência    GATCGACATCAACCCACAGACTGCGGAGCTCAAGAAGCTGCGCAGCTG-TATGTGAC
                        *****

LinFREPA-myc-C1-F      GACTGGCGCGCTAACGTGACGCTTTG-TGCTCGCAGGG-CTTGGCCCGCGAGCGGGCC
LinFREPA-referência    GACTGGCGCGCTAACGTGACGCTTTG-TGCTCGCAGGG-CTTGGCCCGCGAGCGGGCC
                        *****

LinFREPA-myc-C1-F      G--TGCGAGAGCGACS-----CGCSCGACTGACRAGATCAG-TCGAGTATCGACGG
LinFREPA-referência    CGGTGGCGAGAGCGACCGCGGCCCAAGTACCTGGACAGATCCAGTCGAGGGGATCGG
                        *****

LinFREPA-myc-C1-F      GCTGAGCCG-----AGTACGTCGACGTCG--TGSgtTCG--ATTACTCAAGCAGGRA
LinFREPA-referência    ACGGGGCTGAAGCCCGAGTACGTCGACGTCGGTGTCCGATTTACTTCAAGCAGGRA
                        *****

LinFREPA-myc-C1-F      TGCCAAGGATAMGASCGSKGCCYGA-----
LinFREPA-referência    TGCCAGTGGTACGACGCTGCCGACCTGCAACAAGAAGTGAACGAGGAGGGCGCGCA
                        *****

```

**REP-MYC - CLONE 2
REVERSE**

B)

```

LinFREPA-referência    GAGGTCGGTTCGCTCGTGCAGCTGCTTGGCGTGTGTCAAGTGGACGAAGTGTCTGCC
LinFREPA-myc-C1-R      -----GTC-CMT
                        *****

LinFREPA-referência    ATCACGCAGAA-GTCGACGGGCGTGAAGTGTGAAAGCAAGCTC-AAGATGGGCGACA
LinFREPA-myc-C1-R      TTCASSCAGAAATTSRACGGCCGTGARCTYKGAAGCAAGCTYCAAGATWGGSGACA
                        *****

LinFREPA-referência    TGACGGCGGCTGTGAGGTCACTTCTGGAACGATGAGGCAAGGCGTGGTGTACTCCAG
LinFREPA-myc-C1-R      TGACG--CGCTGTGGAG-TCACTYYGGAACGAWKRAGCAAGRSKGG-TGCTATCCAG
                        *****

LinFREPA-referência    TCGGCACCGTTGTGGCGCTGCGGCAGCTGAAGGTTGGCAGTTTCGACGGTGTGACCTCT
LinFREPA-myc-C1-R      TCG-CMCGTTGTGGCGCTGCGGCAGCTGAAGGTTGGCAGTTTCGACGRTGTGACTYTT
                        *****

LinFREPA-referência    CATCCACTTATCAGACCAAGATCGACATCAACCCACAGACTGCGGAGCTCAAGAAGC
LinFREPA-myc-C1-R      CWTCTM-CTTWTARACCAARATCGACATCAACCCCMARACTGCCGACGCTCAAGAAGC
                        *****

LinFREPA-referência    TCGCGACGTGGTATGTGACGACTGGCGGCTAACGTGACGCTTTTGTGCTCGCAGGGGC
LinFREPA-myc-C1-R      TCGCGACGTGGTATKTGACGACTGGCGGCTAACGTGACGCTTTTGTGCTCGCAGGGGC
                        *****

LinFREPA-referência    TTGGCGCCGCGAGCGGGCGGTGGCGAGAGCGACCGCGGCCGCAAGTACCTGGACGAGA
LinFREPA-myc-C1-R      TTGGCGCCGCGAGCGGGCGGTGGCGAGAGCGACCGCGGCCGCAAGTACCTGGACGAGA
                        *****

LinFREPA-referência    TCCAGTGGAGGGGATCGGACGGGCGTGAAGCCGAGTACGTCGACGTCGGTGTGCTTC
LinFREPA-myc-C1-R      TCCAGTGGAGGGGATCGGACGGGCGTGAAGCCGAGTACGTCGACGTCGGTGTGCTTC
                        *****

LinFREPA-referência    CGATTTACTTCAAGCAGGATGCCAGTGGTACGACGCTGCCGACCTGCAACAAGAAGG
LinFREPA-myc-C1-R      CGATTTACTTCAAGCAGGATGCCAGTGGTACGACGCTGCCGACCTGCAACAAGAAGG
                        *****

LinFREPA-referência    TGACCAGGAGGGCGCGAGGGTGAACGCTTTCGCTGCGAAAGTGCAGCAAGACGCTCA
LinFREPA-myc-C1-R      TGACCAGGAGGGCGCGAGGGTGAACGCTTTCGCTGCGAAAGTGCAGCAAGACGCTCA
                        *****

LinFREPA-referência    CGCCGACGCGAGCGCTACCTGTTCCATCCAGTCAAGGACGACGCTCTCAGGCGTGGC
LinFREPA-myc-C1-R      CGCCGACGCGAGCGCTACCTGTTCCATCCAGTCAAGGACGACGCTCTCAGGCGTGGC
                        *****

LinFREPA-referência    TAACGCTCTTCAACGAAGCCGGATCGAGTCTTTGGGATGGAGGCGGCAAGTGAAGC
LinFREPA-myc-C1-R      TAACGCTCTTCAACGAAGCCGGATCGAGTCTTTGGGATGGAGGCGGCAAGTGAAGC
                        *****

LinFREPA-referência    GTCGTGCGCAGGAGGACCTCTTACATCGCAAGCTGGCGAGGGCCGATGAACCAGC
LinFREPA-myc-C1-R      GTCGTGCGCAGGAGGACCTCTTACATCGCAAGCTGGCGAGGGCCGATGAACCAGC
                        *****

LinFREPA-referência    CAGTGGTGTGCTGCTGCGCGTGAAGGAGGAGACGAGCTCAACGCCATGACCGGTGAGG
LinFREPA-myc-C1-R      CAGTGGTGTGCTGCTGCGCGTGAAGGAGGAGACGAGCTCAACGCCATGACCGGTGAGG
                        *****

LinFREPA-referência    AGTCAGACGGCTGCGCATGTGAGTGGTGCATCTCCGAGTTTATGCCGATTGCGGGCA
LinFREPA-myc-C1-R      AGTCAGACGGCTGCGCATGTGAGTGGTGCATCTCCGAGTTTATGCCGATTGCGGGCA
                        *****

LinFREPA-referência    CCTCCGAGGAGACGCGCCGCTCGCGCAGAACCTGCGCACAGAGTGCATGAAATTC
LinFREPA-myc-C1-R      CCTCCGAGGAGACGCGCCGCTCGCGCAGAACCTGCGCACAGAGTGCATGAAATTC
                        *****

LinFREPA-referência    TCCGCTCATCGAGGCTTACGCTGA-----
LinFREPA-myc-C1-R      TCCGCTCATCGAGGCTTAYGCTGAAAGCTGGTGCAGGATCCGATTCGACGATA
                        *****

```

MITCAR-MYC-CLONE 5

C

FORWARD

LinfMitCar-myc-C5-F	CMCCAGRGSACATGGAGCAGAGCTGATCTCAGAGGAGGACTGTCCGC
LinfMitCar-referència	-----ATGTCGCG *****
LinfMitCar-myc-C5-F	CAAGACGGCCGCTCCGTCCGAGCGAGSTTCGTGATCGGTTTTTGC
LinfMitCar-referència	CAAGACGGCCGCTCCGTCCGAGCGAGSTTCGTGATCGGTTTTTGC *****
LinfMitCar-myc-C5-F	GCAGTCATGCCGCGCCGAAACAGSCGCGGTATCCTCGAGATTGCCTTC
LinfMitCar-referència	GCAGTCATGCCGCGCCGAAACAGSCGCGGTATCCTCGAGATTGCCTTC *****
LinfMitCar-myc-C5-F	TTCCATCCGTTTCGACACGACGGCGAAGCGACTGATGGCAACAAGKCCCT
LinfMitCar-referència	TTCCATCCGTTTCGACACGACGGCGAAGCGACTGATGGCAACAAGKCCCT *****
LinfMitCar-myc-C5-F	MNMWANGCGCGCTCCATGGGGAGACGGCCGCAACCTCAACATGATCG
LinfMitCar-referència	CATCATCGCGGCTCCATGGGGAGACGGCCGCAACCTCAACATGATCG *****
LinfMitCar-myc-C5-F	TCTTCAAAAAGCACGCCGACGCGGCTTCTTCAAAAGTTGTGTACCTC
LinfMitCar-referència	TCTTCAAAAAGCACGCCGACGCGGCTTCTTCAAAAGTTGTGTACCTC *****
LinfMitCar-myc-C5-F	TACCGGGCTCCCTGTACGCCACCGTGTACAAGGTTTCCAGCGGCTTA
LinfMitCar-referència	TACCGGGCTCCCTGTACGCCACCGTGTACAAGGTTTCCAGCGGCTTA *****
LinfMitCar-myc-C5-F	CAAGTTCGCCGGACAGCCCTCGTGCAGGACTTCTCAGCTCCAATACC
LinfMitCar-referència	CAAGTTCGCCGGACAGCCCTCGTGCAGGACTTCTCAGCTCCAATACC *****
LinfMitCar-myc-C5-F	GCAGCGGCTTCAAGCGTACTGTGGCAGGCGCACAAAGTTATKTKTKW
LinfMitCar-referència	GCAGCGGCTTCAAGCGTACTGTGGCAGGCGCACAAAGTTATGGA-GGA *****
LinfMitCar-myc-C5-F	YKYGACGGCCGCTGCCTCATCGGCTCGGCGAGGTTCTTCTGTCGCGC
LinfMitCar-referència	CGGACGGCCGCTGCCTCATCGGCTCGGCGAGGTTCTTCTGTCGCGC *****
LinfMitCar-myc-C5-F	TGGATCGGCTGAAGGATTGAGCCAGACGAACGAGGCGCATGCGGAGC
LinfMitCar-referència	TGGATCGGCTGAAGGATTGAGCCAGACGAACGAGGCGCATGCGGAGC *****
LinfMitCar-myc-C5-F	GGTCTTCTGCGCTTCTGCGCAGGAGGGCTTCCGCGGTATGACGCGGG
LinfMitCar-referència	GGTCTTCTGCGCTTCTGCGCAGGAGGGCTTCCGCGGTATGACGCGGG *****
LinfMitCar-myc-C5-F	TACCGTGGTACGATGTGCCGCAACGCCCGGCTCGTCTGTCTAATTG
LinfMitCar-referència	TACCGTGGTACGATGTGCCGCAACGCCCGGCTCGTCTGTCTAATTG *****
LinfMitCar-myc-C5-F	GTGGACAGGCTTACGAAGGGGTACATCTTCGGCTCAGCGACTACCGC
LinfMitCar-referència	GTGGACAGGCTTACGAAGGGGTACATCTTCGGCTCAGCGACTACCGC *****
LinfMitCar-myc-C5-F	CATCGGACTCTCTTCCAGAACATGTGCGCTCCAAGTGTGGGCGGTGCGT
LinfMitCar-referència	CATCGGACTCTCTTCCAGAACATGTGCGCTCCAAGTGTGGGCGGTGCGT *****
LinfMitCar-myc-C5-F	CGCCATCGCCATCTCAACCCGATGGACGTGCTAAGACTGTTGTGACAGC
LinfMitCar-referència	CGCCATCGCCATCTCAACCCGATGGACGTGCTAAGACTGTTGTGACAGC *****
LinfMitCar-myc-C5-F	AGCAGACGGACGCCGAGCGTCCGACGGTATGACGATGGCAGGCGGATG
LinfMitCar-referència	AGCAGACGGACGCCGAGCGTCCGACGGTATGACGATGGCAGGCGGATG *****
LinfMitCar-myc-C5-F	CTGAAGGAGGAGG-CGTGCTGCTCTTCAAGGGCTCAGCGCGAAGAT
LinfMitCar-referència	CTGAAGGAGGAGG-CGTGCTGCTCTTCAAGGGCTCAGCGCGAAGAT *****
LinfMitCar-myc-C5-F	CATCGCTCGGGCGCCGAGCTGAATTTTTGCTACMCAWKGACCSGRA
LinfMitCar-referència	CATCGCTCGGGCGCCGAGCTGAATTTTTGCTACMCAWKGACCSGRA *****

D)

MITCAR-MYC - CLONE 5 REVERSE

LinfMitCar-referència	GTTTTTGGCA-GTCATGCCGGCGCCGACCA-GCCGCC-GGTTAT-CCTC
LinfMitCar-myc-C5-R	-----TGCGMAGTCAMGCGGCGCGCCAGCMAGCCGCGGATTCYTC *****
LinfMitCar-referència	GAGA-TTGCTTCTTCCATCCGTTGCACACGACGGCGAAGCGACTGATGG
LinfMitCar-myc-C5-R	GAGAATTGCTTCTTCCATC-GTTGCACACGACGACGAAGCGACTGATGG *****
LinfMitCar-referència	CAACAAGGGCTCCATCATGCGGGCTCCATGGGGAGAGCGGCCCAAC
LinfMitCar-myc-C5-R	CAACAAGGGCTCCATCATGCGGGCTCCATGGGGAGAGCGGCCCAAC *****
LinfMitCar-referència	CTCAACATGATGCTTCAAAAAGCACGCGGACGCGGCTTCTTTCGAAA
LinfMitCar-myc-C5-R	CTCAACATGATGCTTCAAAAAGCACGCGGACGCGGCTTCTTTCGAAA *****
LinfMitCar-referència	GGTTGTGTACTCTACCCGGGCTCCCTGTACGCCACCGTGTACAAGGTCT
LinfMitCar-myc-C5-R	GGTTGTGTACTCTACCCGGGCTCCCTGTACGCCACCGTGTACAAGGTCT *****
LinfMitCar-referència	TCCAGCGGCTACAAGTTGCCGGACAGCCCTCGTGCAGGACTTCTTC
LinfMitCar-myc-C5-R	TCCAGCGGCTACAAGTTGCCGGACAGCCCTCGTGCAGGACTTCTTC *****
LinfMitCar-referència	AGCTCCAATACCGGACGGCTTCAAGCGGTTACTGTGGCAGGGCGACAA
LinfMitCar-myc-C5-R	AGCTCCAATACCGGACGGCTTCAAGCGGTTACTGTGGCAGGGCGACAA *****
LinfMitCar-referència	GGTTATGGAGGACGCGACGGCGGCTGCCTCATCGGCTCGGCGAGGTTCT
LinfMitCar-myc-C5-R	GGTTATGGAGGACGCGACGGCGGCTGCCTCATCGGCTCGGCGAGGTTCT *****
LinfMitCar-referència	TCTTGTGCGGCTGGATCGGCTGAAGTATTGAGCCAGACGAACGAGGCC
LinfMitCar-myc-C5-R	TCTTGTGCGGCTGGATCGGCTGAAGTATTGAGCCAGACGAACGAGGCC *****
LinfMitCar-referència	GCCATGCGGAGCGGTTCTTCCGCGCTTCTGCGCCAGGAGGGCTTCCGCGG
LinfMitCar-myc-C5-R	GCCATGCGGAGCGGTTCTTCCGCGCTTCTGCGCCAGGAGGGCTTCCGCGG *****
LinfMitCar-referència	TATGTACGCGGTTACCGTGGTACGATGTGCGGCAACGCCCGGCTCGT
LinfMitCar-myc-C5-R	TATGTACGCGGTTACCGTGGTACGATGTGCGGCAACGCCCGGCTCGT *****
LinfMitCar-referència	TCTGTCTATTGGTGGCACAGCCTTACGAAGGGGTACATCTTCCGCTC
LinfMitCar-myc-C5-R	TCTGTCTATTGGTGGCACAGCCTTACGAAGGGGTACATCTTCCGCTC *****
LinfMitCar-referència	AGCGACTACCGCATGCGACTCTTCCAGAACATGTGCGGCTCCACTGT
LinfMitCar-myc-C5-R	AGCGACTACCGCATGCGACTCTTCCAGAACATGTGCGGCTCCACTGT *****
LinfMitCar-referència	GGGCGGCTGCGTCCGATCGCCATCTTAACCCGATGGACGTGCTCAAGA
LinfMitCar-myc-C5-R	GGGCGGCTGCGTCCGATCGCCATCTTAACCCGATGGACGTGCTCAAGA *****
LinfMitCar-referència	CTCGTGTGACAGCAGCAGCGGACGCGGAGCGTCCGACGGTATGACGATG
LinfMitCar-myc-C5-R	CTCGTGTGACAGCAGCAGCGGACGCGGAGCGTCCGACGGTATGACGATG *****
LinfMitCar-referència	GCGACGGCGATGCTGAAGGAGGAGGGCTGCTGCTCTTCAAGGGCTC
LinfMitCar-myc-C5-R	GCGACGGCGATGCTGAAGGAGGAGGGCTGCTGCTCTTCAAGGGCTC *****
LinfMitCar-referència	CACGCGAAGATCATCGCTCGGCGCCGAGCTGATTTTTGCGTACACCA
LinfMitCar-myc-C5-R	CACGCGAAGATCATCGCTCGGCGCCGAGCTGATTTTTGCGTACACCA *****
LinfMitCar-referència	TGACCGAGTACTTCTCAAGGTGATGAACGACTCAAGAAGCGTTGA---
LinfMitCar-myc-C5-R	TGACCGAGTACTTCTCAAGGTGATGAACGACTCAAGAAGCGTTGA--- *****

POLIA-MYC- CLONE 2

FORWARD

Table with 3 columns: LinfPOLIA-myc-C2-F, LinfPOLIA-referència, and DNA sequence. Contains 16 rows of sequence data.

POLIA-MYC - CLONE 2

REVERSE

Table with 3 columns: LinfPOLIA-referència, LinfPOLIA--myc-C2-R, and DNA sequence. Contains 16 rows of sequence data.

LRR-MYC- CLONE 2
FORWARD

G)

LRR-myc-C2-F
LinLRR-referência CGCTRCGCMCATGGAGCAGAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGGCGGACCCTGCGCACACC
-----ATGGCGGACCCTGCGCACACC

LRR-myc-C2-F
LinLRR-referência CGCSATGACTTCTGGGAGCAGCAGCAGCAGTGGTTCAAATGACCCGGGTGCTTTGAG
CGCGATGACTTCTGGGAGCAGCAGCAGCAGTGGTTCAAATGACCCGGGTGCTTTGAG

LRR-myc-C2-F
LinLRR-referência GCCATGAACAACAACAGCATGCAGTTGCTGCAGATGCGCGTGCACACCTTGAACGGCAG
GCCATGAACAACAACAGCATGCAGTTGCTGCAGATGCGCGTGCACACCTTGAACGGCAG

LRR-myc-C2-F
LinLRR-referência GTGGCGATGCTATCTGCGCAGGTCATGGCAGCCGCGCTGCCGCGATCTTTTCAGGCTTAC
GTGGCGATGCTATCTGCGCAGGTCATGGCAGCCGCGCTGCCGCGATCTTTTCAGGCTTAC

LRR-myc-C2-F
LinLRR-referência CCRGGCGTCACGTACGGAATGTCCGCCGCCACCTCCAAGCTCACCAAATGACTGCCATG
CCAGGCGTCACGTACGGAATGTCCGCCGCCACCTCCAAGCTCACCAAATGACTGCCATG

LRR-myc-C2-F
LinLRR-referência CCCACACAGATGCCCGGAATATGTACTTCTACCAGCCGCTGGCATGCCCGCGTGCT
CCCACACAGATGCCCGGAATATGTACTTCTACCAGCCGCTGGCATGCCCGCGTGCT

LRR-myc-C2-F
LinLRR-referência CCGGCTAACGGTCCGCTGCGGACGACGGCAAGGCGTGAAGCAGTGAAGATGAATC
CCGCTAACGGTCCGCTGCGGACGACGGCAAGGCGTGAAGCAGTGAAGATGAATC

LRR-myc-C2-F
LinLRR-referência YAGCGCATGGGTGTTGGCCTATGGTGGCGCTGCTGTTGGCAGCACCAGGCCCCGAG
CAGCGCATGGGTGTTGGCCTATGGTGGCGCTGCTGTTGGCAGCACCAGGCCCCGAG

LRR-myc-C2-F
LinLRR-referência GCAGCCGACGGCAGCAGCATGACTTTGATGCAAGCAACTTCGTGGTGTCCCGACC
GCAGCCGACGGCAGCAGCATGACTTTGATGCAAGCAACTTCGTGGTGTCCCGACC

LRR-myc-C2-F
LinLRR-referência AGCGGCATCTCCGCTTCCCGGGTGTGATCGCCGGGTGCGCACTCAACGGCGCCGGC
AGCGGCATCTCCGCTTCCCGGGTGTGATCGCCGGGTGCGCACTCAACGGCGCCGGC

LRR-myc-C2-F
LinLRR-referência CCTGGCATAACCCTTATGCCCCGGGCGCAGAGGTGGCTTTGGCGTCTCGATGATGCCG
CCTGGCATAACCCTTATGCCCCGGGCGCAGAGGTGGCTTTGGCGTCTCGATGATGCCG

LRR-myc-C2-F
LinLRR-referência GGTCCGCCGACGCTCCACTCCACCAAGATGAGCAATGCGCTTCTTCAAGAGCGTTT
GGTCCGCCGACGCTCCACTCCACCAAGATGAGCAATGCGCTTCTTCAAGAGCGTTT

LRR-myc-C2-F
LinLRR-referência GGTTTCTCGGACCGGCATGAACGGGGCGGGGCGACGGCATGAACGCAACATGAGC
GGTTTCTCGGACCGGCATGAACGGGGCGGGGCGACGGCATGAACGCAACATGAGC

LRR-myc-C2-F
LinLRR-referência AGCCTTCAAGCAGTGTGCTGTGACGCTGGACCG-CTTCAGAGCACAACGARAAG--CT
AGCCTTCAAGCAGTGTGCTGTGACGCTGGACCGCTTCAGAGCACAACGARAAGCTT

LRR-MYC - CLONE 2
REVERSE

H)

LinLRR-referência
LRR-myc-C2-R CTCCTGAACCTGCAGGGATGCTCACCTTGTGTGCGACACAATGCGGTGCGCATGATCGCT
-----GCATWRWATCGT

LinLRR-referência
LRR-myc-C2-R GCGCACAA-CACACGCT-CAGCCGGTAAACCTGCGGGTGTGACCGGTGACGGACG
KCGMCAACACACGCTYARGGGTAACTTYYTGGGGKGCSCGGACG---A

LinLRR-referência
LRR-myc-C2-R CGCAGCCACTTGCAGCTCTCCCTCATGTTTACCCTGACCTGTCCGGCAGATGATCG
CGGAGCAGCTTGGCAGCTTCTCCATGTT-ACTCAACTGTCCGGCAGATGATCR

LinLRR-referência
LRR-myc-C2-R GCACCGCTTCGTTGAGGCGATCTGCACGGTGGC-GCCAGCTCAGCCGCTTCCCATC
GCMCG-CTTCGCTGRAGGCGATCTGCACGRGTGCGCCAGCTCAGCCGCTTCCCATC

LinLRR-referência
LRR-myc-C2-R AACAGCTGCAGCAGCTGACGGATGTCAAGTTTGAAGAACCTGTCCGAGCTGAAGCTG
A-CAGCTGCCAGCAGTACGGATGTCAAGTTTGAAGAACCTGTCCGAGCTGAAGCTG

LinLRR-referência
LRR-myc-C2-R CTCTACTGCCGCTACTCGAAAACATAGACCCGCCACCATCACCAAGCTGCTGCCGGC
CTCTACTGCCGCTACTCGAAAACATAGACCCGCCACCATCACCAAGCTGCTGCCGGC

LinLRR-referência
LRR-myc-C2-R ATCGGTGAGATCTGCTCAGCTGAACGTGGAGGCGTCCGCTTCGTCAGCTGACCTC
ATCGGTGAGATCTGCTCAGCTGAACGTGGAGGCGTCCGCTTCGTCAGCTGACCTC

LinLRR-referência
LRR-myc-C2-R TCTAACTTGGCGCAGTCCCGCTTGAAGAACTCAACTGCAAGAGCAACCCAACCTT
TCTAACTTGGCGCAGTCCCGCTTGAAGAACTCAACTGCAAGAGCAACCCAACCTT

LinLRR-referência
LRR-myc-C2-R AGGGATCTGGACTGGTCTGAGCATTCCCAACGGCAAGGGCTTCGAGTCTGGAG
AGGGATCTGGACTGGTCTGAGCATTCCCAACGGCAAGGGCTTCGAGTCTGGAG

LinLRR-referência
LRR-myc-C2-R ATGCTGGAGTGAAGGGTGGAGTCTGCTGAGCTTCCGAGTGCATATCACTCGCTA
ATGCTGGAGTGAAGGGTGGAGTCTGCTGAGCTTCCGAGTGCATATCACTCGCTA

LinLRR-referência
LRR-myc-C2-R AAGCGACTCAAGCGGTGCTCTCACGAACCTGGCATCACCAATGAAGAGCTTCCCGC
AAGCGACTCAAGMRRTGCTCTCACGAACCTGGCATCACCAATGAAGAGCTTCCCGC

LinLRR-referência
LRR-myc-C2-R ATCTCAGCTGCCGGCCTATCTGTATTCACTTGAAGACTGCGTGGCATCACGAAT
ATCTCAGCTGCCGGCCTATCTGTATTCACTTGAAGACTGCGTGGCATCACGAAT

LinLRR-referência
LRR-myc-C2-R GTGGACTGCCTTGCAGATGTGCCACTCTCAAAAGTGATGAGCATGCGGATGAG
GTGGACTGCCTTGCAGATGTGCCACTCTCAAAAGTGATGAGCATGCGGATGAG

LinLRR-referência
LRR-myc-C2-R CATGAGGACACCAAGGCAAGCGCTGCTGCCGCAAGACTGGTCCGAGATCATC
CATGAGGACACCAAGGCAAGCGCTGCTGCCGCAAGACTGGTCCGAGATCATC

LinLRR-referência
LRR-myc-C2-R TTCGGCGGGCAGCAACACCAGGCAAGGTGTTCTGCCCATATATGACGCGAGC
TTCGGCGGGCAGCAACACCAGGCAAGGTGTTCTGCCCATATATGACGCGAGC

LinLRR-referência
LRR-myc-C2-R AGCGCTTCCGCTCATGATCCCAACCCAGTCCGAACACTGACGCGAGGACACGCC
AGCGCTTCCGCTCATGATCCCAACCCAGTCCGAACACTGACGCGAGGACACGCC

LinLRR-referência
LRR-myc-C2-R TTTCCGTA-----
TTTCCGTAAGCTTGGTACGGATCCGAATTCGTCGAGATATCTAGACTGAGKAT

**WD-MYC- CLONE 1
FORWARD**

D)

LinfWD-myc-C1-F TKKKTTTTTCAGCTCWCACATGAGACAGAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGAGCAAGT
 LinfWD-referència -----ATGAGCAAGT

LinfWD-myc-C1-F ACGTGGCCCCACTGGCAAGTAGCGCCAGCAGCCCCCGCTGCGGACAAACGGTGTGCTG
 LinfWD-referència ACGTGGCCCCACTGGCAAGTAGCGCCAGCAGCCCCCGCTGCGGACAAACGGTGTGCTG

LinfWD-myc-C1-F ATATCACCAAGGTGAAGATCTGCTCTGGACACACGCGCCAGTATGCCACATTAACATA
 LinfWD-referència ATATCACCAAGGTGAAGATCTGCTCTGGACACACGCGCCAGTATGCCACATTAACATA

LinfWD-myc-C1-F GTGAAATCATCGATGGCACCTTCTGGTTTTGTGACATCTGTGCCACGACGCAAAACCGATGC
 LinfWD-referència GTGAAATCATCGATGGCACCTTCTGGTTTTGTGACATCTGTGCCACGACGCAAAACCGATGC

LinfWD-myc-C1-F TTCGCAATGGCCAGAMCGGTGACTGGGTAGGAACGTTT GAGGGGCACAAGGGCGCTGTGT
 LinfWD-referència TTCGCAATGGCCAGACCGGTGACTGGGTAGGAACGTTT GAGGGGCACAAGGGCGCTGTGT

LinfWD-myc-C1-F TCTGCTCCGCCCTCAACTCTGGTGCACGCGGCTGGTACGGGTAGCGGCACACTCTG
 LinfWD-referència TCTGCTCCGCCCTCAACTCTGGTGCACGCGGCTGGTACGGGTAGCGGCACACTCTG

LinfWD-myc-C1-F CGATGGTCTGGGACGCTTACTGCTGCAAGAAACTT CATGTGTGGAGCCACCAAGTACA
 LinfWD-referència CGATGGTCTGGGACGCTTACTGCTGCAAGAAACTT CATGTGTGGAGCCACCAAGTACA

LinfWD-myc-C1-F TCAAGTCGTGCAGTGGATGGATCAGCGGATGYAACAGGCTGCTTCAATGTTAAACATCC
 LinfWD-referència TCAAGTCGTGCAGTGGATGGATCAGCGGATGYAACAGGCTGCTTCAATGTTAAACATCC

LinfWD-myc-C1-F GCATCTACGACGCTACTCGGTACGATGCTGACCCCTGTGCGTTTTGGTAGCCCCGACGCCA
 LinfWD-referència GCATCTACGACGCTACTCGGTACGATGCTGACCCCTGTGCGTTTTGGTAGCCCCGACGCCA

LinfWD-myc-C1-F TTAACGTCAAGTCGACATACTTTTGGACACAAACACCATGTTGACAGCGTGGGAGAAG
 LinfWD-referència TTAACGTCAAGTCGACATACTTTTGGACACAAACACCATGTTGACAGCGTGGGAGAAG

LinfWD-myc-C1-F TGATCATGAAGTGGGATCTCCGTGACACATCCGGGCCCTACCTGCGCCGTGAGATCCCC
 LinfWD-referència TGATCATGAAGTGGGATCTCCGTGACACATCCGGGCCCTACCTGCGCCGTGAGATCCCC

LinfWD-myc-C1-F GTC CAACTTTGTGGAATACACGACCCGCACTCTATTGTGCCGCTCATGAGAAGACA
 LinfWD-referència GTC CAACTTTGTGGAATACACGACCCGCACTCTATTGTGCCGCTCATGAGAAGACA

LinfWD-myc-C1-F TCAGCTTATCGACATCACGTCCTTGGAGGTGAAGACAGCTTCAACACCTCGGAGGATG
 LinfWD-referència TCAGCTTATCGACATCACGTCCTTGGAGGTGAAGACAGCTTCAACACCTCGGAGGATG

LinfWD-myc-C1-F TCGAGTGCAGCTCTCTYTCACAGACGGGACGCGCTCGCGGCCGGATCAAAACTGAAGG
 LinfWD-referència TCGAGTGCAGCTCTCTYTCACAGACGGGACGCGCTCGCGGCCGGATCAAAACTGAAGG

LinfWD-myc-C1-F CCAAGGAGTTCACGCTGGATG-CGTGAGGTGGAGTCCA-CCGGC-CCACCACGGACC-G
 LinfWD-referència CCAAGGAGTTCACGCTGGATG-CGTGAGGTGGAGTCCA-CCGGC-CCACCACGGACC-G

LinfWD-myc-C1-F TGTTTMM-ATCCGCTGGGCTCARATG-AACTCTACSCCTCCG-CGCTGAGAC--GCA
 LinfWD-referència TGTTTMM-ATCCGCTGGGCTCARATG-AACTCTACSCCTCCG-CGCTGAGAC--GCA

LinfWD-myc-C1-F TGGTGCAGCTGTGGTCTCGCM-GAGATCATCGAAGTMCAGCACGACGCTTARAAGC
 LinfWD-referència TGGTGCAGCTGTGGTCTCGCM-GAGATCATCGAAGTMCAGCACGACGCTTARAAGC

**WD-MYC - CLONE 1
REVERSE**

J)

LinfWD-referència ATGAGCAAGTACGTGGCCCCACTGGC--AAGTAGCGCC-AGCAGCCCCGCTGCGGAC
 LinfWD-myc-C1-F -----TSTTGTCCCCCTGCCAAGATARGGCCAGCAGCCCT--TGCAGAC

LinfWD-referència AACGGTGTGCTGATATCACAAGGTGAAGATCTGCTCTGGACACACGCGCCAGTATGC
 LinfWD-myc-C1-F A-CGGTGT-GCTGAW-TCAC--AAGTAGA--TYGCTCTG-ACACACGCGCCAGTATGC

LinfWD-referència CACATTAACACAGTAAATCATCGATGGCACCTTCTGGTTTTGTGACATCTGTGCCACGAC
 LinfWD-myc-C1-F -ACATTA-CTACAGTGAA-TCATCGATGGCAC--TCTG--TTKKGACATCTGTC-ACGAC

LinfWD-referència GCAAAACGATGCTTCGCAATGGCCAGACCGGTGACTGGTAGGAACGTTT GAGGGGCAC
 LinfWD-myc-C1-F GCAA-CCGATGCTTCGCAATGGCCAGACCGGTGACTGGT--AGAAGCTT-GAGGRGAC

LinfWD-referència AAGGGCGCTGTGTTCTGCTCCGCCCTCAACTCTGGTGCACGCGGCTGGTACGGGTAGC
 LinfWD-myc-C1-F AAGGRGCTGTGTTCTGCTCCGCCCTCAACTCTGGTGCACGCGGCTGGTACGGGTAGC

LinfWD-referència GCGACTACTCTGCGATGGTCTGGGACGCTTACTGCGCAAGAAACTT CATGTGTGGAGC
 LinfWD-myc-C1-F GCGCACTACTCTGCGATGGTCTGGGACGCTTACTGCGCAAGAAACTT CATGTGTGGAGC

LinfWD-referència CACCAAAGTACATCAAGTCGTGCGACTGGATGGATCAGCGGATTGCCACAGGCTGCTTC
 LinfWD-myc-C1-F CACCAAAGTACATCAAGTCGTGCGACTGGATGGATCAGCGGATTGCCACAGGCTGCTTC

LinfWD-referència GATGGTAACATCCGCATCTACGACGCTACTCGGTACGATGCTGACCTCTGTGTTTTGGT
 LinfWD-myc-C1-F GATGGTAACATCCGCATCTACGACGCTACTCGGTACGATGCTGACCTCTGTGTTTTGGT

LinfWD-referència AGCCCCGACGCCATTAACGTCAAGTCGACATACTTTTGGACACAACACCATGGTGACA
 LinfWD-myc-C1-F AGCCCCGACGCCATTAACGTCAAGTCGACATACTTTTGGACACAACACCATGGTGACA

LinfWD-referència GCGTGCAGAGACGTGATCATGAAGTGGGATCTCCGTGACACATCCGGGCCCTACTGCGC
 LinfWD-myc-C1-F GCGTGCAGAGACGTGATCATGAAGTGGGATCTCCGTGACACATCCRRRMMWACCTGCGC

LinfWD-referència CGTGAGATTCCCGTCTCAACTTTGTGGAATACACGACCCGCACTCTATTGTGCGCGCT
 LinfWD-myc-C1-F CGTGAGATTCCCGTCTCAACTTTGTGGAATACACGACCCGCACTCTATTGTGCGCGCT

LinfWD-referència CATGAGAAGAGCATCAGCTTATCGACATCACGCTCTGGAGGTGAAGACAGCTTCAAC
 LinfWD-myc-C1-F CATGAGAAGAGCATCAGCTTATCGACATCACGCTCTGGAGGTGAAGACAGCTTCAAC

LinfWD-referència ACCTCGGAGGATGTGAGTGCAGCTCTCTCACCAGACGGGACGCGCTCGCGGCCGA
 LinfWD-myc-C1-F ACCTCGGAGGATGTGAGTGCAGCTCTCTCACCAGACGGGACGCGCTCGCGGCCGA

LinfWD-referència TCAAAACTGAAGCCAAAGGATTACGCTGGATGGCTCGAGTGGAGTCCAACCGCGC
 LinfWD-myc-C1-F TCAAAACTGAAGCCAAAGGATTACGCTGGATGGCTCGAGTGGAGTCCAACCGCGC

LinfWD-referència CACCACGGACCCGTGTTCCACATCCGCTGGGCCCTCAGATGAAACTCTACGCTCCGGC
 LinfWD-myc-C1-F CACCACGGACCCGTGTTCCACATCCGCTGGGCCCTCAGATGAAACTCTACGCTCCGGC

LinfWD-referència GCTGAGGACGGCATGGTGCAGTGTGGCCCTCGACAGATCATCGAGAAGTACGACAG
 LinfWD-myc-C1-F GCTGAGGACGGCATGGTGCAGTGTGGCCCTCGACAGATCATCGAGAAGTACGACAG

LinfWD-referència GACGCCTAG-----
 LinfWD-myc-C1-F AACGCCTAGAAGCTGGTACCGGATCCGAATCTGTCGACGATATCTAGACTCGAGKAT

Anexo 2. Validação por sequenciamento dos clones fusionados à *tag myc* no N-terminal. As análises correspondem ao alinhamento múltiplo das sequências obtidas por sequenciamento Sanger em relação às sequências de referência dos respectivos genes. Para cada clone, são apresentados os alinhamentos das leituras *forward* (A, C, E, G, I, K) e *reverse* (B, D, F, H, J, L). (A–B) *LinfRepA*-myc clone 2; (C–D) *LinfMitCar*-myc clone 5; (E–F) *LinfPoliA*-myc clone 2; (G–H) *LinfLRR*-myc clone 2;; (I–J) *LinfWD*-myc clone 1; (K–L) *LinfRNABP*-myc clone 2.