

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

TAISSA DE OLIVEIRA DE CASTRO

Caracterização funcional de proteínas do Sistema Ubiquitina-Proteassoma de *L. infantum*.

São Carlos
2025

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

TAISSA DE OLIVEIRA DE CASTRO

Caracterização funcional de proteínas do Sistema Ubiquitina-Proteassoma de *L. infantum*.

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof^º. Dr^ª. Felipe Roberti Teixeira

São Carlos
2025

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

Folha de aprovação

Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Trabalho de Conclusão de Curso da candidata Taissa de Oliveira de Castro, realizada em 09/12/2025.

Prof. Dr. Marcelo Damario Gomes
Universidade de São Paulo, USP, Brasil

Dr. Jonatas Erick Maimoni Campanella
Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Brasil.

Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira
Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Brasil

Dedico este trabalho à minha família, em especial aos meus pais, Adriana e Vilmar, que sempre acreditaram em mim. Obrigada pelo apoio constante, pela força nos momentos difíceis e pelo amor que me sustentou durante toda essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira, pela oportunidade, pela orientação dedicada e pela paciência em me ensinar. Seus conselhos e conhecimentos foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho e para minha formação acadêmica.

Aos professores e professoras do curso, que contribuíram de forma significativa para minha trajetória, com conhecimentos teóricos, práticos e valores pessoais que levarei comigo para a vida.

À instituição de ensino, pela infraestrutura e pelos recursos disponibilizados durante o curso.

Ao Laboratório de Bioquímica Celular, pelo acolhimento, suporte, discussões e amizade ao longo desta jornada. De maneira especial, agradeço à Camila, por todo o apoio, pelos ensinamentos indispensáveis ao desenvolvimento deste projeto e pela paciência, cujo aprendizado levarei para a vida.

Aos colegas e amigos da graduação, pela parceria, pelas conversas que tornaram a rotina intensa mais leve, pelas risadas e pela troca constante de experiências. Em especial às minhas colegas de apartamento, Maria Eduarda Saladine e Maria Eduarda Pavani, cuja convivência, apoio e amizade foram essenciais para que eu pudesse seguir em frente com mais tranquilidade e motivação.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Minha gratidão a cada uma delas que fez parte desta caminhada.

RESUMO

O Sistema Ubiquitina-Proteassoma (SUP) é o principal responsável pela proteólise intracelular em eucariotos, sendo composto pelas enzimas E1 (ativadora de ubiquitina), E2 (carreadora de ubiquitina), E3 (ubiquitina ligases) e o proteassoma, uma estrutura catalítica capaz de degradar a proteínas ubiquitinadas. O SUP é essencial para a alternância de hospedeiros em protozoários parasitas *Leishmania*, responsáveis por causar a leishmaniose. Apesar de sua importância, os componentes do SUP são pobremente caracterizados em *Leishmania spp.*, particularmente *Leishmania infantum*, o agente causador da leishmaniose visceral no Brasil. Neste estudo, foram gerados mutantes nulos de onze genes codificantes de proteínas relacionados ao SUP de *L. infantum*, sendo sete relacionadas às E3 ubiquitina ligases da classe LinfCRL1 (*LinfFLP1*, *LinfFLP2*, *LinfFLP3*, *LinfFLP4*, *LinfFLP5*, *LinfFLP6* e *LinfNEDD8*) e quatro relacionados ao *Ribosomal Quality Control (RQC)*, sendo eles: *LinfLTN1*, *LinfPirh2*, *LinfKLHDC10* e *LinfHLTF*. Um total de sete linhagens viáveis foram confirmadas por PCR, sendo elas: Δ *LinfFLP1*, Δ *LinfFLP2*, Δ *LinfFLP5*, Δ *LinfFLP6*, Δ *LinfLTN1*, Δ *LinfPirh2* e Δ *LinfHLTF*. Análises de proliferação celular indicaram redução no perfil de crescimento da linhagem Δ *LinfLTN1*, nocaute para o gene codificante da proteína ortóloga a Listerin de *H. sapiens*. A análise estrutural comparativa entre estas proteínas demonstrou alta similaridade, arguindo sobre papel funcional semelhante. O nocaute dos genes *LinfNEDD8*, *LinfKLHDC10* e *LinfFLP3* não gerou linhagens viáveis, sugerindo que esses genes podem ser essenciais ao parasita. A análise estrutural das proteínas LinfKLHDC10 e KLHDC10 de *H. sapiens* evidenciou topologia semelhante, sugerindo relação funcional destas proteínas nestes organismos. Assim, os resultados deste projeto demonstram a importância dos componentes do SUP na proliferação e viabilidade de *L. infantum*, com destaque para *LinfLTN1* e *LinfKLHDC10* que apresentam características estruturais similares às proteínas de *H. sapiens*, e *LinfNEDD8* e *LinfFLP3* que são potencialmente essenciais ao parasita.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*; Sistema Ubiquitina Proteassoama; Controle de Qualidade Ribossomal; CRL1, F-box.

ABSTRACT

The Ubiquitin-Proteasome System (UPS) is the main pathway responsible for intracellular proteolysis in eukaryotes, and is composed of E1 (ubiquitin-activating), E2 (ubiquitin-conjugating), and E3 (ubiquitin ligase) enzymes, as well as the proteasome, a catalytic structure capable of degrading target proteins. The UPS is essential for host alternation in parasitic protozoa of the genus *Leishmania*, the causative agents of leishmaniasis. Despite its importance, components of the UPS remain poorly characterized in *Leishmania* spp., particularly *Leishmania infantum*, the etiological agent of visceral leishmaniasis in Brazil. In this study, null mutants were generated for eleven *L. infantum* genes encoding proteins related to the UPS, including seven associated with the LinfCRL1 E3 ubiquitin ligases (*LinfFLP1*, *LinfFLP2*, *LinfFLP3*, *LinfFLP4*, *LinfFLP5*, *LinfFLP6*, and *LinfNEDD8*) and four associated with Ribosomal Quality Control (RQC): *LinfLTN1*, *LinfPirh2*, *LinfKLHDC10*, and *LinfHLTF*. A total of seven viable mutant lines were confirmed by PCR: Δ *LinfFLP1*, Δ *LinfFLP2*, Δ *LinfFLP5*, Δ *LinfFLP6*, Δ *LinfLTN1*, Δ *LinfPirh2*, and Δ *LinfHLTF*. Cell proliferation analyses indicated reduced growth in the Δ *LinfLTN1* lineage, which lacks the gene encoding the ortholog of human Listerin. Knockout of *LinfNEDD8*, *LinfKLHDC10*, and *LinfFLP3* did not yield viable lines, suggesting these genes may be essential for the parasite. Structural analysis of *LinfKLHDC10* and human *KLHDC10* revealed similar topology, further indicating potential functional conservation. Overall, the results of this project highlight the importance of UPS components in the viability and homeostasis of *L. infantum*, with particular emphasis on *LinfLTN1* and *LinfKLHDC10*, which share structural features with their human counterparts, and on *LinfNEDD8* and *LinfFLP3*, which appear to be potentially essential for parasite survival.

Keywords: *Leishmania infantum*; Ubiquitin-Proteasome System; Ribosomal Quality Control; CRL1; F-box.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ciclo de vida das <i>Leishmanias</i> spp.	16
Figura 2: Formas de ubiquitinação de substrato.....	17
Figura 3: Sistema ubiquitina proteassoma.....	18
Figura 4: Principais famílias de E3 ligases.....	19
Figura 5: Complexo multisubunidade CRL1.	21
Figura 6: Processo de ativação e inativação do complexo CRL1..	22
Figura 7: Via do controle de qualidade ribossomal (RQC).	25
Figura 8: Metodologia de edição gênica por CRISPR Cas9 em <i>L. infantum</i>	30
Figura 9: Amplificação cassetes de reparo e sgRNA para nocaute gênico por CRISPR-Cas9.....	35
Figura 10: PCRs diagnósticas para validação das linhagens nocautes viáveis de <i>L. infantum</i> $\Delta FLP1::PUR/ \Delta FLP1::BLA$, $\Delta FLP2::PUR/ \Delta FLP2::BLA$, $\Delta FLP5::PUR/ \Delta FLP5::BLA$ e $\Delta FLP6::PUR/ \Delta FLP6::BLA$	36
Figura 11: PCRs diagnóstica para validação da linhagem nocaute incompleto de <i>L. infantum</i> $\Delta FLP4::PUR/ \Delta FLP4::BLA$	37
Figura 12: Perfil das curvas de crescimento das linhagens celulares <i>L. infantum</i> Cas9T7, $\Delta LinfFLP1$, $\Delta LinfFLP2$ e $\Delta LinfFLP5$ durante 9 dias.....	38
Figura 13: Amplificação dos cassetes de reparo e sgRNA para nocaute gênico por CRISPR-Cas9.....	39
Figura 14: Confirmação do single nocaute da LinfNEDD8.....	40
Figura 15: Curva de crescimento e taxa de proliferação entre as linhagens celulares <i>L. infantum</i> Cas9T7 e <i>L. infantum</i> single $\Delta NEDD8$ durante 9 dias.....	40
Figura 16: Análise da sequência de aminoácidos e estrutura proteica da NEDD8 e LinfNEDD8.....	41
Figura 17: Estrutura proteica de CAND1, UBA3, NAE1 e DCN1 like protein 5 e seus ortólogos em <i>L. infantum</i> , realizadas Alphafold (Cheng et al., 2023).....	43
Figura 18: Amplificação dos cassetes de reparo e sgRNA para nocaute gênico por CRISPR-Cas9.....	44
Figura 19: PCRs diagnósticas para validação das linhagens nocautes viáveis de <i>L. infantum</i> $\Delta LinfLTN1::PUR/\Delta LinfLTN1::BLA$, $\Delta LinfPirh2::PUR/\Delta LinfPirh2::BLA$ e $\Delta LinfHLTF::PUR/\Delta LinfHLTF::BLA$	45
Figura 20: Curva de crescimento entre as linhagens celulares <i>L. infantum</i> Cas9T7, $\Delta LinfLTN1$, $\Delta LinfPirh2$, $\Delta LinfHLTF$ durante 9 dias.....	46

Figura 21: Curva de crescimento e taxa de proliferação entre as linhagens celulares *L. infantum* Cas9T7, $\Delta LinfLTN1$, $\Delta LinfPirh2$, $\Delta LinfHLTF$ durante 9 dias.....47

Figura 22: Alinhamento de sequências das proteínas LTN1 e KLHDC10 de *H. sapiens* com seus ortólogos de *L. infantum*, realizada por Clustal Omega (EMBL-EBI; Institute,).....50

Figura 23: Alinhamento estrutural realizado por Alphafold (Cheng et al., 2023) das proteínas RQC de *L. infantum* e *H. sapiens*.52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Primers utilizados para knockout dos genes deste trabalho que estão, disponíveis no site LeishGEdit.....	28
Tabela 2: Reação de PCR e ciclagem para amplificação dos cassetes de reparo	31
Tabela 3: Reação de PCR e ciclagem para amplificação dos sgRNA	31
Tabela 4: Primers utilizados para verificação da presença ou a ausência dos respectivos genes nas linhagens nocautes de <i>L. infantum</i>	32
Tabela 5: Primers utilizados para verificação da inserção dos genes de resistência nas linhagens nocautes de <i>L. infantum</i>	33

LISTA DE ABREVIATURAS

Δ – Nocaute

ATP – Trifosfato de adenosina

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CAND – Cullin-Associated and Neddylation-Dissociated 1

Cas9 – CRISPR-associated enzyme 9

CO₂ – Dióxido de carbono

CRL – Cullin RING-Ligase

CRL1 – Cullin 1 RING-Ligase

CRL2 – Cullin 2 RING-Ligase

DUBs – Enzimas deubiquitinasas

E1 – Enzima ativadora de ubiquitina

E2 – Enzima carreadora de ubiquitina

E3 – Enzima ligante de ubiquitina

FLP – Fbox like protein

HECT – Homologous to the E6AP Carboxyl Terminus

HEPES – ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(2-etano sulfônico)

HLTF – Helicase-like transcription fator

KLHDC10 – Kelch domain-containing protein 10

LC – Leishmaniose cutânea

LinfSKP1 – Gene SKP1 de *Leishmania infantum*

LinfCUL1 – Gene CUL1 de *Leishmania infantum*

LinfRBX1 – Gene RBX1 de *Leishmania infantum*

LinfFLPs – Gene FLPs de *Leishmania infantum*

LinfLTN1 – Gene LTN1 de *Leishmania infantum*

LinfKLHDC10 – Gene KLHD10 de *Leishmania infantum*

LinfPirh2 – Gene Pirh2 de *Leishmania infantum*

LinfHLTF – Gene HLTF de *Leishmania infantum*

LinfNEDD8 – Gene NEDD8 de *Leishmania infantum*

LM – Leishmaniose mucocutânea

LTN1 – E3 ubiquitin-protein ligase listerin

LV – Leishmaniose visceral

M199 – meio de cultivo

NAE1 – NEDD8-activating enzyme E1 subunit 1

NEDD8 – Ubiquitin-like protein NEDD8

PBS – Solução Salina Tamponada com Fosfato

PCR – Reação em cadeia polimerase

PD – Population Doubling

RBX1 – Ring-Box 1

RQC – Ribosomal quality control

SBF – Soro Bovino Fetal

RMSD – Root mean square deviation

sgRNA – RNA guia

SKP1 – S-phase kinase-associated protein 1

SUP – Sistema ubiquitina proteassoma

T7 – Polimerase T7

Ub – ubiquitina

UBA3 – Ubiquitin Like Modifier Activating Enzyme 3

Sumário

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 <i>Leishmania</i> spp.	14
1.2 Ciclo de vida <i>Leishmania infantum</i>	15
1.3 Sistema Ubiquitina Proteassoma	16
1.4 SUP em <i>Leishmania</i> spp.	19
1.5 Complexo CRL1 e proteínas F-box.....	20
1.6 Proteínas RQC (Controle de qualidade ribossomal).....	23
2. OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivo específico	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 Cultivo de promastigota de <i>L. infantum</i>	26
3.2 Geração de linhagem <i>L. infantum</i> Cas9T7	26
3.3 Geração de mutantes nulos dos genes alvos	27
3.4 Confirmação dos mutantes nulos viáveis de <i>L. infantum</i>	31
3.5 Determinação da taxa de crescimento de promastigotas.	33
3.6 Efeito do nocaute gênico na proliferação celular	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Efeito do nocaute dos genes <i>LinfFLPs</i> em <i>L. infantum</i>	34
4.1.1 Avaliação da taxa de crescimento de Δ <i>LinfFLP1</i> , Δ <i>LinfFLP2</i> , Δ <i>LinfFLP5</i> e Δ <i>LinfFLP6</i>	38
4.3 Efeitos do nocaute do gene <i>LinfNEDD8</i>	39
4.4 Efeito do nocaute dos genes relacionado ao RQC em <i>L. infantum</i>	43
4.4. Avaliação da taxa de crescimento e proliferação das linhagens Δ <i>LinfLTN1</i> , Δ <i>LinfPirh2</i> , Δ <i>LinfHLTF</i>	45
4.5 Análises estruturais das proteínas LTN1, KLHDC10 e NEDD8 de <i>H. sapiens</i> e os ortólogos em <i>L. infantum</i>	47
5. CONCLUSÃO	52
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Leishmania* spp.

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada, causada por protozoários cinetoplastídeos do gênero *Leishmania*, pertencentes a cerca de 20 espécies descritas (“Leishmaniasis”, ONU). A doença possui três apresentações clínicas principais: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LM) e leishmaniose visceral (LV) (Mathison; Bradley, 2023). Esta última apresenta a forma mais grave e potencialmente fatal, se não tratada. Nos continentes Africano, Europeu e Asiático, a espécie causadora é a *Leishmania donovani*, enquanto na América é a espécie *Leishmania infantum*.

A leishmaniose visceral concentra a maior parte dos casos no Brasil, na África Oriental e na Índia, com estimativas globais variando entre 50.000 a 90.000 novos casos por ano (“Leishmaniasis”, ONU). A doença está frequentemente associada a condições de pobreza, imunossupressão, desnutrição, moradias precárias e à ausência de acesso a serviços médicos adequados (Mathison; Bradley, 2023).

Os medicamentos disponíveis atualmente para o tratamento das leishmanioses são limitados e apresentam alta toxicidade. Além disso, a eficácia terapêutica tem diminuído em diversos locais devido a seleção de parasitas resistentes, que surgem por mutações genéticas que reduzem a sensibilidade do parasita aos fármacos (Ponte-Sucre et al., 2017). A eficácia dos medicamentos antileishmania varia de acordo com o estado imunológico do hospedeiro (Van Griensven; Diro, 2019). Os antimoniais pentavalentes são os principais fármacos empregados contra a leishmaniose e vêm sendo utilizados desde a década de 1920 (Ponte-Sucre et al., 2017). Na Índia, o uso desses medicamentos foi substituído devido ao surgimento de resistência disseminada, porém ainda são utilizados em outras regiões do mundo (Ponte-Sucre et al., 2017). Embora eficazes, esses compostos apresentam elevada toxicidade, entre os efeitos adversos mais graves associados aos antimoniais estão toxicidade cardíaca, pancreatite, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (Van Griensven; Diro, 2019).

A anfotericina B também é utilizada no tratamento, mas sua forma convencional (desoxicolato) está associada a efeitos adversos, como nefrotoxicidade e hipocalcemia, já sua formulação lipossomal reduz substancialmente o risco de toxicidade, entretanto, seu custo elevado limita o uso em muitos países endêmicos (Ponte-Sucre et al., 2017; Van

Griensven; Diro, 2019). Outros medicamentos incluem a miltefosina, que apresenta efeitos tóxicos geralmente leves e transitórios, porém possui potencial teratogênico (Van Griensven; Diro, 2019). A paromomicina, por sua vez, apresenta baixa frequência de eventos adversos, mas ainda pode causar nefrotoxicidade, ototoxicidade e hepatotoxicidade, porém, seu espectro de ação é relativamente restrito entre as diferentes espécies de *Leishmania* (Ponte-Sucre et al., 2017).

1.2 Ciclo de vida *Leishmania infantum*

O ciclo de vida de *Leishmania* é dixênico, alternando entre dois hospedeiros distintos: vertebrado (geralmente um mamífero) e um invertebrado (inseto vetor). A transmissão da *Leishmania* ocorre por meio da picada de insetos fêmeas da família Flebotomíneos infectados. Nos continentes Africano, Europeu e Asiático é causado pelas espécies do gênero *Phlebotomus* enquanto na América é causado pelas espécies do gênero *Lutzomyia* (Sasidharan; Saudagar, 2021).

Este parasita possui duas principais formas morfológicas ao longo do seu ciclo de vida: amastigota e promastigota (Sasidharan; Saudagar, 2021). A diferenciação entre essas formas ocorre de acordo com o hospedeiro em que o parasita se encontra. A forma infectante em mamífero, promastigota metacíclica, é fagocitada por linfócitos mononucleares, principalmente macrófagos, onde se diferenciam intracelularmente em amastigota, dentro do fagossomo e se replicam por fissão binária (Mathison; Bradley, 2023). O inseto vetor é infectado após se alimentar do sangue de um hospedeiro mamífero contendo macrófagos infectados com amastigota. No intestino do inseto, a forma amastigota se diferencia em promastigota procíclica, que irá se dividir por fissão binária e passar por vários processos de diferenciação até se tornar a forma promastigota metacíclica (Sasidharan; Saudagar, 2021). Esta última, se localiza na probóscide do vetor, pronta para ser transmitida a um novo hospedeiro vertebrado durante a alimentação sanguínea, sendo introduzida juntamente com a saliva do inseto (Sasidharan; Saudagar, 2021). Assim, completa-se o ciclo de vida (Figura 1).

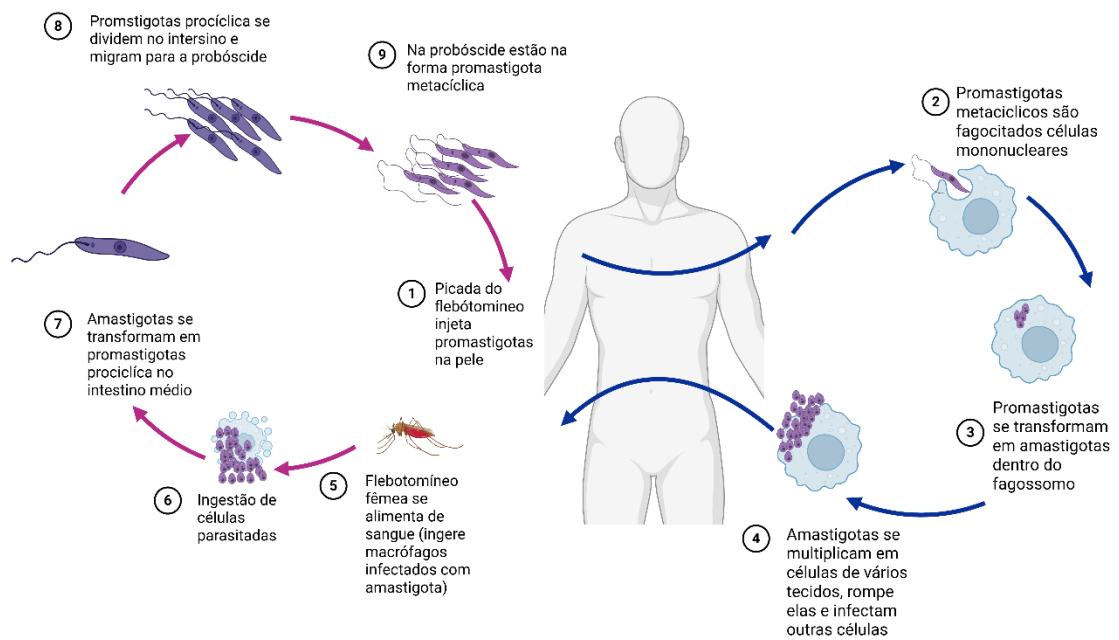


Figura 1. Ciclo de vida das *Leishmanias* spp. São descritos em nove passos os eventos relacionados ao ciclo de vida dos parasitas Leishmania. Fonte: Adaptado de “CDC - DPDx - Leishmaniose”, 2024 .

1.3 Sistema Ubiquitina Proteassoma

A renovação das proteínas intracelulares em células eucarióticas é realizada por dois sistemas proteolíticos autônomos: os lisossomos e os proteassomas (Muñoz et al., 2015). Os proteassomas são responsáveis pela maior parte da degradação de proteínas intracelulares, sendo composto por proteases multisubunidade e com atividade multicatalítica (Correia et al., 2024; Muñoz et al., 2015).

A modificação por ubiquitina (Ub) é mais complexa que apenas a degradação proteolítica, desempenhando papéis essenciais para progressão do ciclo celular, transdução de sinal, morte celular, respostas imunes, metabolismo e controle de qualidade ribossomal (Muñoz et al., 2015). A modificação pós-traducional por ubiquitina, denominada ubiquitinação, ocorre de maneira reversível, através de uma ligação covalente isopeptídica entre o resíduo de glicina C-terminal da ubiquitina com resíduos de lisina ou resíduo de metionina N-terminal dos substratos alvo (Clague; Heride; Urbé, 2015). A ubiquitina possui 76 resíduos de aminoácidos com sete resíduos de lisina (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 e Lys63) e um resíduo de metionina N-terminal, que possibilitam a formação de diferentes cadeias de ubiquitinas, com funções distintas (Chen; Chen; Huang, 2019).

As proteínas podem ser modificadas por monoubiquitinação, multimonoubiquitinação ou poliubiquitinação (Figura 2). Dentre os diversos tipos de

cadeias, as mais predominantes são as monoubiquitinações e as poliubiquitinações via resíduos Lys48 e Lys63 (Mevisen; Komander, 2017). A monoubiquitinação está relacionada ao reconhecimento de proteínas de complexos ou sua regulação alostérica, enquanto a poliubiquitinação ligadas às Lys48 e Lys11, é um sinal para degradação proteossomal, e as ligadas a Lys63, Lys6, Lys33 e Lys27 tem papéis não degradativos (Chen; Chen; Huang, 2019; Mevisen; Komander, 2017).

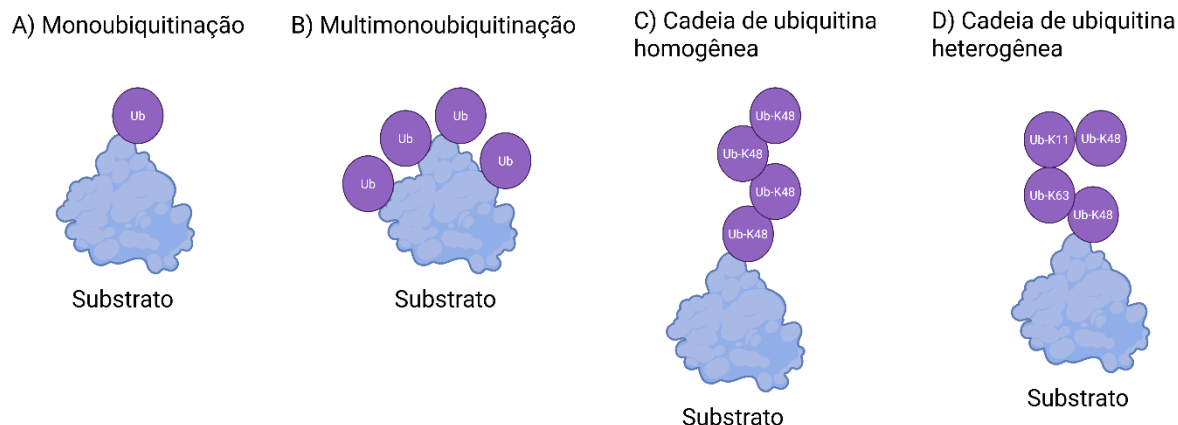


Figura 2: Formas de ubiquitinação de substrato. Diferentes tipos de modificações por ubiquitinação dos substratos-alvo. Fonte: Adaptado de Komander; Rape, 2012. Criado em <https://BioRender.com>.

O processo de ubiquitinação acontece por uma cascata enzimática de três etapas: primeiramente a enzima ativadora de ubiquitina (E1) ativa a ubiquitina através de uma reação dependente de ATP, em seguida, a enzima conjugadora de ubiquitina (E2) recebe a ubiquitina em um resíduo de cisteína do seu sítio ativo, e as enzimas ubiquitinas ligases (E3) reconhecem o substrato e catalisam a transferência da ubiquitina da E2 para o alvo proteico (Çetin et al., 2021). A remoção da ubiquitina dos substratos acontece por meio das enzimas denominadas Deubiquitinases (DUBs), que reciclam essa molécula na célula (Komander; Clague; Urbé, 2009). Observamos essa transferência de ubiquitina e a reciclagem dela na Figura 3.

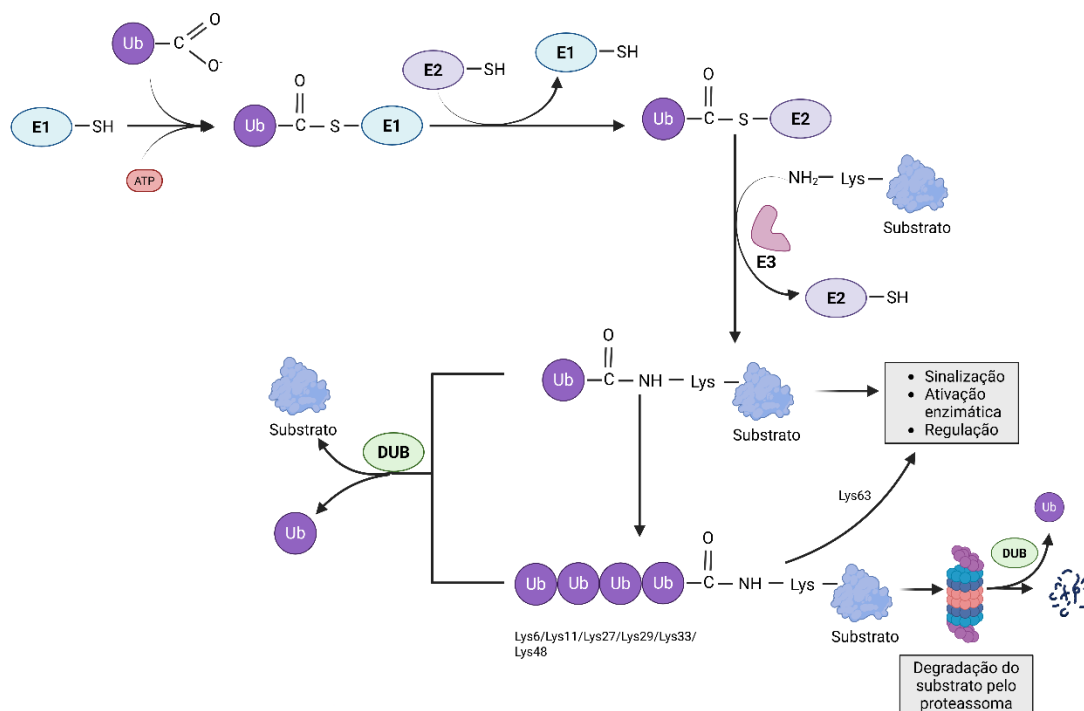


Figura 3: Sistema ubiquitina proteassoma. Esquema do processo de ubiquitinação de um substrato pelas enzimas E1, E2 e E3 ligases e a deubiquitinação dos substratos ou sua degradação pelo proteassoma. Fonte: Adaptado de Bedford et al., 2011, Komander; Clague; Urbé, 2009 e Nandi et al., 2006. Criado em <https://BioRender.com>.

Existem enzimas E1 relacionadas a ativação de ubiquitina, e também E1 que ativam proteínas semelhantes à ubiquitina denominadas Ub-like, como NEDD8, SUMO, ATG8, ISG15 dentre outras. Elas recrutam as enzimas E2 para facilitar a transferência do tioéster das Ub-like que estão ligadas a E1, para a cisteína catalítica da E2 (Toma-Fukai; Shimizu, 2021). Em humanos existem oito enzimas E1 conhecidas e que ativam as Ub e Ub-like, possuindo, um domínio de adenilação homodimérico ou heterodimérico, responsáveis pela acil-adenilação dessas moléculas (Schulman; Wade Harper, 2009). As famílias de enzimas E2 compreendem cerca de 40 genes humanos envolvidos na transferência de Ub e Ub-like, e todas as E2s apresentam um domínio denominado UBC (Stewart et al., 2016).

As enzimas E3 interagem diretamente com o substrato, determinando a especificidade do SUP, por isso há um grande número de E3s comparado as E1 e E2. No genoma humano, são codificados mais de 600, havendo grande diversidade estrutural entre elas (Toma-Fukai; Shimizu, 2021). As E3 são classificadas em 3 famílias: HECT, RBR e RING (Figura 4) (Toma-Fukai; Shimizu, 2021) de acordo com o domínio de

interação com as E2. As E3 RING ligases, compõe a maior família de E3 e contém o domínio catalítico RING ou U-box. O domínio RING apresenta a sequência Cys-X₂-Cys-X(9-39)-Cys-X(1-3)-His-X(2-3)-Cys-X₂-Cys-X(4-48)-Cys-X₂-Cys, onde X pode representar qualquer aminoácido (Sampson et al., 2023). Esse domínio utiliza resíduos de cisteína e histidina para coordenar dois íons de zinco na sua estrutura de oito ligantes (Sampson et al., 2023). Nessa família podemos ter algumas proteínas atuando como E3 em monômeros ou homodímero, como é o caso da TRAF6 (Fatores Associados ao Receptor TNF 6) e TRIM (Motivo Tripartido contendo ligases E3), outras atuam como proteínas multissubunidades, como é o caso das CRL (Cullin Ring Ligases) (Sampson et al., 2023).

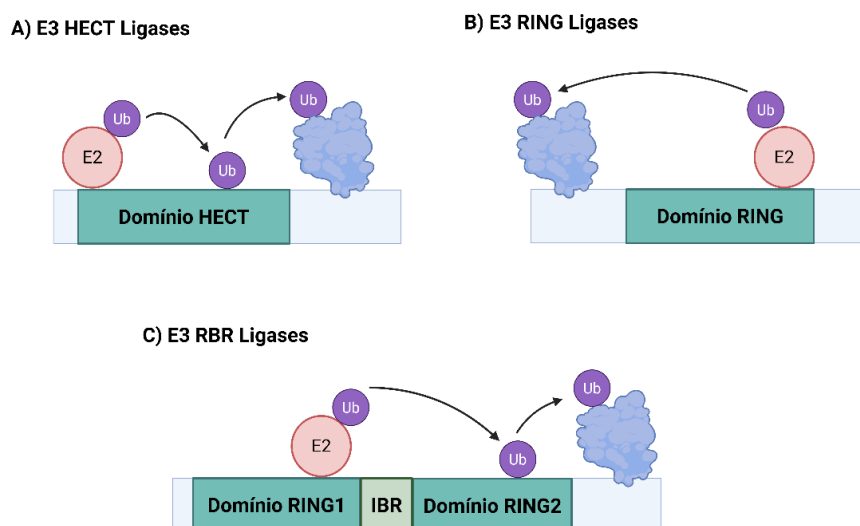


Figura 4: Principais famílias de E3 ligases. A) Ligase E3 HECT, é responsável pela transferência da Ub da enzima E2 para um resíduo catalítico da E3, antes de ir para o substrato. B) Ligase E3 RING, é responsável pela aproximação da E2-Ub com o substrato, promovendo a transferência direta da Ub. C) Ligases E3 RBR, seu domínio RING1 recruta a E2-Ub, o domínio RING2 recebe a ubiquitina antes de transferir para o substrato, enquanto o domínio IBR estabiliza essa interação. Fonte: Adaptado de Sun; Wei; Jin, 2020. Criado em <https://BioRender.com>.

1.4 SUP em *Leishmania* spp.

Uma característica marcante no ciclo de vida de protozoários patogênicos são as mudanças morfológicas que ocorrem entre hospedeiros vertebrados e invertebrados (Muñoz et al., 2015). Essas mudanças envolvem alterações drásticas, na forma, tamanho e estrutura, exigindo uma regulação da proteólise de forma cuidadosa. Por esse motivo, é importante compreender como o proteoma difere significativamente em cada uma das formas promastigota e amastigota (Damianou et al., 2020; Muñoz et al., 2015).

Em *Leishmania* spp. foram identificados vários genes ortólogos de proteínas ubiquitina, E1, E2, E3 e deubiquitinases (DUBs) (Bijlmakers, 2021). Em *L. infantum*, já foi caracterizado o complexo LinfCRL1, que desempenha funções essenciais na regulação do ciclo celular do parasita e sua capacidade de infecção (Correia et al., 2024). Além disso, o proteassoma tem se destacado como um alvo terapêutico promissor em cinetoplastídeos, com compostos inibitórios capazes de comprometer de maneira eficaz a sobrevivência desses organismo (Khare et al., 2016).

Estudos de edição gênica via CRISPR-Cas9 também revelaram a importância das DUBs em *Leishmania*. Entre as 20 DUBs avaliadas, várias mostraram papéis críticos na diferenciação e infecção, enquanto outras se mostraram essenciais para a proliferação normal da forma amastigota no hospedeiro. Algumas ainda mostraram-se indispensáveis para a progressão do ciclo de vida, reforçando seu potencial como alvos terapêuticos (Damianou et al., 2020).

Diante do papel importante do SUP na regulação do ciclo celular, endocitose, autofagia e resposta a infecção e estresse, a caracterização deste sistema em *Leishmania* pode identificar novos alvos terapêuticos para o tratamento das leishmanioses (Burge; Mottram; Wilkinson, 2022).

1.5 Complexo CRL1 e proteínas F-box

As Cullin-RING ligases (CRLs) correspondem a maior e mais bem estudada classe de E3 ligases em mamíferos. Elas são compostas por uma proteína Cullin, que atua como *scaffold*, conectando uma proteína RING-box, responsável pela ligação à enzima E2, e uma proteína adaptadora que interage com o substrato (Sampson et al., 2023) (Figura 5). As CRL1 representam a maior classe de proteínas dentro da família das CRLs, com a proteína SKP1 (*S-phase kinase-associated protein 1*) atuando como proteína adaptadora, ligando-se as proteínas com domínio F-box, que reconhecem e se ligam ao substrato, apresentando-o para a ubiquitinação (Figura 5) (Ho; Tsai; Chien, 2006). No genoma humano, existem 69 genes que codificam as proteínas F-box, sendo classificadas em três grupos: FBXW (F-box com domínio WD-40), FBXL (F-box com repetição rica em leucina) e FBXO (F-box com outros domínios) (Sampson et al., 2023).

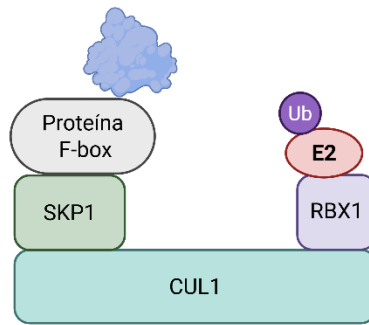


Figura 5: Complexo multisubunidade CRL1. O complexo CRL1 é formado pela CUL1, atuando como proteína central do complexo, interagindo no seu domínio C- terminal com a RBX1, responsável por recrutar a E2-Ub. N domínio N- terminal, CUL1 interage com a SKP1, que se liga com as proteínas da família F-Box, responsáveis pelo reconhecimento do substrato que serão ubiquitinados. Fonte: Adaptado de Correia et al., 2024 . Criado em <https://BioRender.com>.

As proteínas F-box possuem um motivo estrutural de aproximadamente 50 resíduos de aminoácidos, localizados na sua região N ou C-terminal, que permitem a interação com a SKP1 (Ho; Tsai; Chien, 2006). Dessa forma, juntamente com a Cul1 e RING-box, formam o complexo CRL1 (Kipreos; Pagano, 2000). Essas proteínas são responsáveis por diversas vias de regulação e processos biológicos, como replicação de DNA, transcrição, diferenciação celular e morte celular, por meio da SUP (Khan et al., 2021).

Para o complexo CRLs funcional, é necessário a conjugação da molécula NEDD8 (Ub-like) a um resíduo de lisina no C-terminal da Cullin 1 (Sun, 2020). Essa modificação pós-traducional, promove uma alteração estrutural no complexo, conferindo uma conformação mais aberta, facilitando o acesso ao substrato que será ubiquitinado (Sun, 2020). Esse processo mencionado é chamado nedilação, e ocorre por meio de uma cascata enzimática análoga à ubiquitinação, envolvendo as enzimas E1, E2, E3 específicas para NEDD8 (Harper; Schulman, 2021). Assim como a ubiquitinação, a nedilação é uma modificação pós-traducional reversível. A remoção da NEDD8 é realizada pelo signalossomo COP9 (CSN) (Rusnac; Zheng, 2020). Dessa forma, a presença ou ausência da NEDD8 na Cullin 1 vai depender da ação e controle da CSN, que irá fazer esse deslocamento da NEDD8 do seu substrato, deixando a Cullin 1 ativa ou inativa (Harper; Schulman, 2021). Quando a Cullin 1 não está nedilada, ela pode estar associada a CAND1 (Proteína associada a Cullin e dissociada da nedilação 1), que se associa e forma um complexo com a Cul1-RBX1, mantendo-o inativo, uma vez que impede a interação com a SKP1 e as proteínas F-box (Harper; Schulman, 2021). Portanto, os processos de

nedilação, denedilação e associação da CAND1, são fundamentais para a modulação da atividade das CRLs, funcionando como um mecanismo controle que alterna entre os estados inativo e ativo do complexo, de acordo com a necessidade de ubiquitinação de proteínas alvos (Figura 6).

Em *L. infantum*, foi caracterizada o complexo LinfCRL1, no qual se identificou a presença de seis proteínas F-Box e uma proteína semelhante a NEDD8, no interactoma desse parasita, indicando um mecanismo regulatório conservado em comparação ao observado em células de mamíferos (Correia et al., 2024). E observou-se a importância dos componentes de LinfCRL1, pois não se obteve linhagens nocaute para *LinfSKP1* e *LinfRBX1*, sugerindo essencialidade, enquanto o nocaute viável, Δ *LinfCUL1*, apresentou prejuízo na proliferação, alteração do ciclo celular e estimulou a formação de rosetas (Correia et al., 2024).

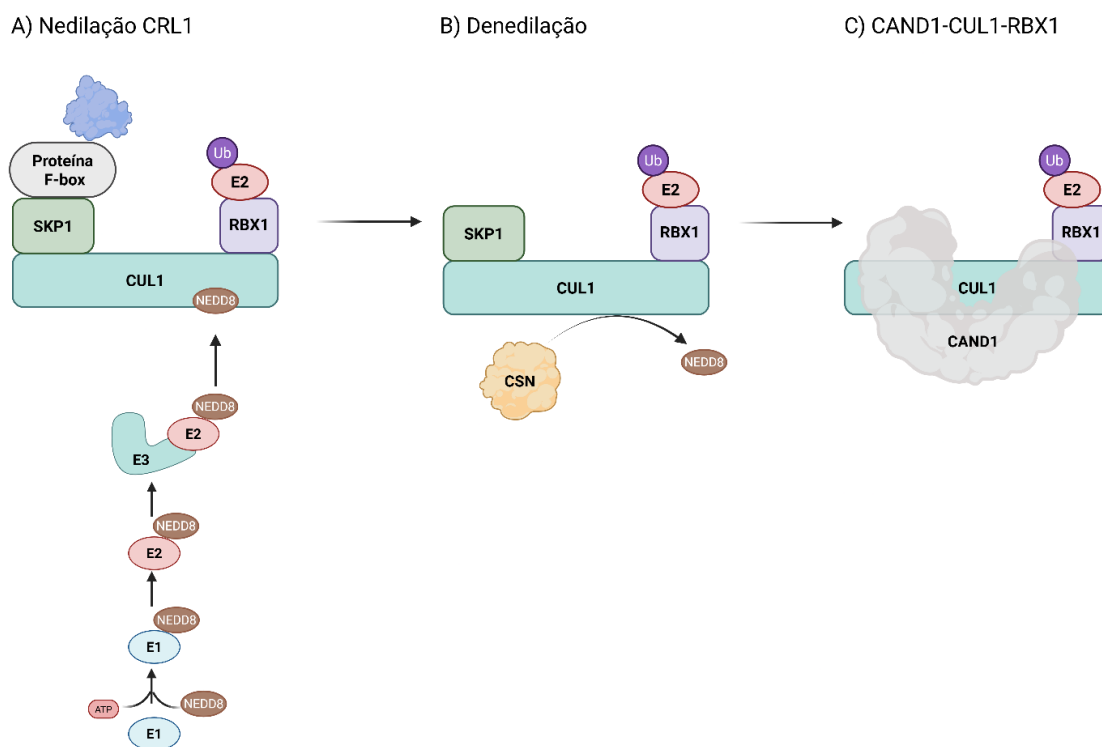


Figura 6: Processo de ativação e inativação do complexo CRL1. A) Processo de nedilação da CRL1, a proteína NEDD8 é ativada por uma E1, transferida para a E2, e com auxílio de uma E3, interage com a E2-Ub e transfere para o substrato CUL1, promovendo ativação do complexo CRL1 para ubiquitinação de substratos. B) Após degradação dos substratos alvos, o complexo CSN associa-se a CRL1 e remove a NEDD8. C) Na ausência da NEDD8, a proteína CAND1 liga-se a CUL1, deslocando SKP1 e proteínas F-box, mantendo o complexo CRL1 inativo. Fonte: Adaptado de Harper; Schulman, 2021. Criado em <https://BioRender.com>.

1.6 Proteínas RQC (*Ribosomal Quality Control*)

Durante a tradução, os ribossomos podem estagnar levando a produção de polipeptídeos truncados, que podem ser deletérios para a célula (Joazeiro, 2019). Caso essas proteínas aberrantes não sejam degradadas, podem perder sua função ou até mesmo adquirir funções prejudiciais. Além disso, a estagnação compromete a disponibilidade de ribossomos para novas rodadas de síntese proteica (Filbeck et al., 2022). Este sistema de remoção de cadeias truncadas que pode culminar com sua degradação pelo proteassoma é denominado Ribosomal Quality Control (RQC) (Figura 7).

A parada do ribossomo pode ser transitória, quando associada ao cumprimento de determinada função biológica, ou persistentes, levando a colisão de ribossomos (Best et al., 2023). Esse fenômeno pode ocorrer de duas formas: ribossomos parados na extremidade 3' do mRNA e ribossomos paralisados internamente dentro do mRNA (Filbeck et al., 2022). No primeiro caso, a parada na extremidade 3' do mRNA ocorre quando o ribossomo atinge o final do transcrito e o sítio A permanece disponível, ou ainda quando há clivagem endonucleolítica que libera esse sítio (Filbeck et al., 2022). Em ambas as situações, fatores de resgate de ribossomos são recrutados para promover a dissociação das subunidades ribossomais, permitindo a atuação subsequente da RQC (Filbeck et al., 2022; Juskiewicz et al., 2018).

No segundo caso, quando os ribossomos são paralisados internamente dentro do mRNA, a estagnação ocorre porque um ribossomo em tradução encontra uma sequência de mRNA propensa à parada, sendo subsequentemente alcançado por um ribossomo posterior, resultando na formação de di-ribossomos/tri-ribossomos colididos (Juskiewicz et al., 2018; Scazzari et al., 2025). Essas colisões acabam gerando centros de interação para vários fatores, que medeiam diversas vias de controle baseada na tradução, como a resposta integrada ao estresse (ISR), resposta ribotóxica ao estresse (RSR) ou as vias RQC (Best et al., 2023). Durante esse processo, há formação de uma interface das subunidades 40S-40S, na qual as proteínas ribossomais RPS10/eS10 e RPS20/uS10 são reconhecidas como alvos pela E3 ubiquitina ligase ZNF598, responsável por sua poliubiquitinação (Juskiewicz et al., 2018). Posteriormente, há a desmontagem dos ribossomos colididos pelo complexo desencadeador do controle de qualidade ribossomal (RQT), gerando uma subunidade 60S associada ao peptidil-tRNA, que se torna alvo da RQC (Best et al., 2023).

O sistema RQC começa pela detecção da subunidade maior do ribossomo (60S) obstruída, realizada pela enzima Rqc2/NEMF, que se liga a porção tRNA que é exposta (Joazeiro, 2019). A partir desse reconhecimento, o processo pode seguir duas vias distintas de, a RQC-L, dependente de E3 ligase LTN1, e a RQC-C, independente de LTN1 (Filbeck et al., 2022). Na RQC-L, há o recrutamento da LTN1 e é estabilizado sua ligação na subunidade 60S, por meio da Rqc2. A partir dessa interação, a LTN1 promove a poliubiquitinação preferencial de resíduos de Lys48 presente na cadeia nascente, fora do túnel de saída do ribossomo (Joazeiro, 2019). Quando esse resíduo de lisina não está exposto, a Rqc2 é responsável pela formação da cauda CAT, recrutando tRNA para estender a cadeia nascente com resíduo de alanina ou treonina, até que um resíduo de lisina seja revelado para permitir ação da LTN1 (Joazeiro, 2019). Após a poliubiquitinação, ocorre o recrutamento de outros componentes do sistema, como o complexo Cdc48/VCP, que se liga à cadeia nascente poliubiquitinada, e direciona para degradação pelo proteassoma (Joazeiro, 2019). Para que isso ocorra, é necessário a liberação da cadeia nascente do tRNA, à qual está covalentemente ligada, sendo esse processo catalisado pela enzima Vms1/ANKZF1, finalizando a tradução, e promovendo a liberação da subunidade 60S e o mRNA (Joazeiro, 2019).

Na RQC-C, por não haver o recrutamento da LTN1, a Rqc2 continua atuando na extensão da cadeia nascente, promovendo a formação da cauda CAT. A liberação da cadeia nascente, por meio da hidrólise catalisada pela Ptrh1, que cliva a ligação entre o tRNA e o peptídeo nascente (Filbeck et al., 2022). Devido à presença da cauda CAT, ela é reconhecida como um degron por outras E3 ligases, como Pirh2 ou CRL2-KLHDC10 (Filbeck et al., 2022). Tanto as vias RQC-L e RQC-C são observadas resumidas na Figura 7.

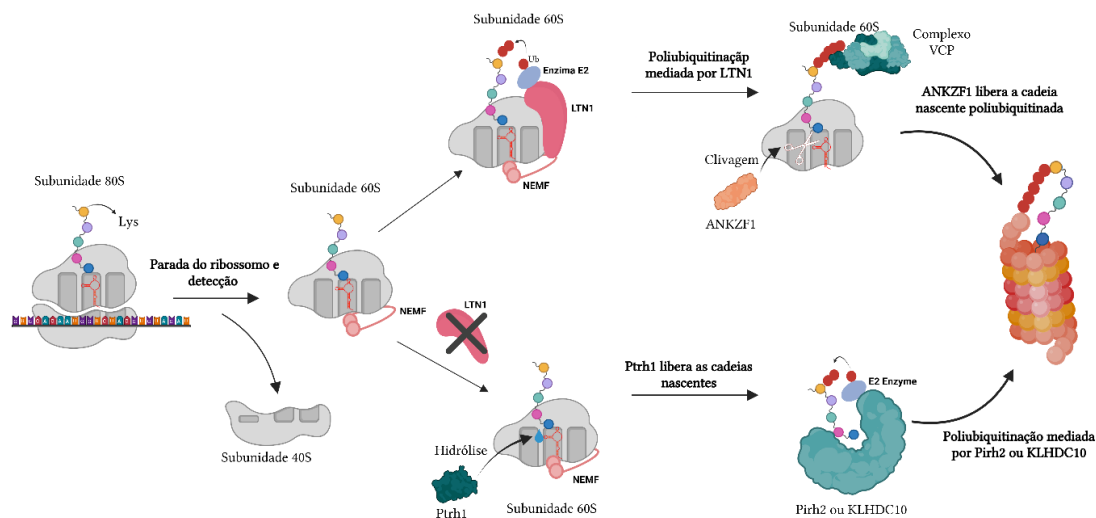


Figura 7: Via do controle de qualidade ribossomal (RQC). Após a paralisação do ribossomo, ocorre sua detecção e separação em subunidades. A subunidade maior é reconhecida pela proteína NEMF, que se liga ao tRNA exposto, e adiciona a cauda CAT. A partir desse ponto, o processo pode seguir duas vias: RQC-L, dependente de LTN1, na qual ocorre a poliubiquitinação do substrato na saída do túnel do ribossomo, seguida de clivagem e degradação pelo proteassoma; e RQC-C, independente de LTN1, em que temos a hidrólise da proteína mal-formada, e devido a cauda CAT formada, é direcionada a outras E3 ligases da RQC, que poliubiquitinam e direcionam ao proteassoma. Fonte: Adaptado de Joazeiro, 2019 e Filbeck et al 2021. Criado em <https://BioRender.com>.

A disfunção deste sistema tem sido associada a doenças, afetando o sistema nervoso, neurodegeneração progressiva e distúrbios neuromusculares de início precoce (Inada; Beckmann, 2024). Até o momento, o controle de qualidade ribossomal ainda não foi descrito em *Leishmania* spp., ressaltando a importância de estudos que explorem essa via para aprofundar a compreensão da biologia do parasita.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar funcionalmente os genes relacionados ao sistema ubiquitina proteassoma em *Leishmania infantum*.

2.2 Objetivo específico

- Caracterizar fenotipicamente em *Leishmania infantum* os genes LINF_240015400, LINF_150014400, LINF_140018100, LINF_330019800, LINF_340019100 e LINF_360032300 codificadores das F-box-like proteins (LinfFlps) 1 a 6, o gene LINF_340026400, semelhante a *LinfNEDD8* e os genes

relacionados ao controle de qualidade ribossomal (RQC), que são ortólogos a LTN1, Pirh2, KLHDC10 e HLTF de *H. sapiens*. Para isso:

- Realização das PCR para amplificação dos cassetes de reparo e sgDNAs para nocaute desses genes;
- Realização das transfecções para produção dos mutantes nulos;
- Confirmação dos nocautes por meio de PCR diagnóstica dos cassetes de marcação auxotrófica e do *locus* gênico;
- Avaliar a taxa de crescimento e proliferação celular dos mutantes nulos viáveis;
- Avaliar as características estruturais das proteínas de interesse.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo de promastigota de *L. infantum*

O isolado utilizado de *L. infantum* HU-UFS14 foi obtido em 2009 a partir de um paciente de 15 anos atendido no Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe. Este foi caracterizado em 2015 pelo Laboratório de Imunoparasitologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) e teve seu genoma sequenciado e anotado (Maruyama et al., 2019). Para cultivo, o parasita foi descongelado em gelo, lavado duas vezes com PBS 1X e centrifugado a 1650 x g por 10 minutos a 4°C. O precipitado resultante foi ressuspenso em 5 mL de meio M199 magic (20% de soro bovino fetal (SBF) inativado a 55°C por 1 hora, 0,1 mM de adenina, 2,5 mg/mL de hemina, 1% de penicilina/estreptomicina e 0,3 mg/mL de biopterina). A cultura foi incubada a 27°C em atmosfera de 5% de CO₂ por um período de 3 a 5 dias, com repicagem realizada conforme a confluência celular.

3.2 Geração de linhagem *L. infantum* Cas9T7

Para viabilizar a utilização da ferramenta CRISPR-Cas9 e possibilitar a transcrição *in vivo* do sgRNA a partir do produto de PCR de fita dupla (sgDNA), foi desenvolvida uma linhagem de *L. infantum* expressando as enzimas Cas9 e T7 RNA polimerase. Essa linhagem foi obtida por meio da transfecção da cepa selvagem com o plasmídeo pTB007 (Beneke et al., 2017). O plasmídeo circularizado utilizado neste processo possibilita a expressão simultânea das enzimas Cas9, T7 RNA polimerase e do marcador de resistência à higromicina, que atua na forma episossomal no parasita.

A transfecção foi realizada utilizando 2×10^7 células por transfecção da linhagem *Leishmania infantum* HU-UFS14 na fase log de crescimento. As células foram centrifugadas a $1650 \times g$ por 10 minutos a temperatura ambiente, descartado o sobrenadante e realizado a lavagem das células com tampão 1 x Tb-BSF (200 mM Na_2HPO_4 , 70 mM NaH_2PO_4 , 15 mM KCl e 150 mM HEPES) e 1,5 mM de CaCl_2 , e centrifugadas novamente nas mesmas condições. Após o fim da lavagem, sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado no tampão 1 x Tb-BSF e 1,5 mM de CaCl_2 . Em seguida, as células ressuspensionadas foram homogeneizadas com solução contendo 10 μg do plasmídeo pTB007 e transferidas para uma cubeta 2 mm para transfecção. Utilizamos o sistema de eletroporação ECM 830 Square Wave (BTX) em três pulsos de 1,5 kV, com intervalos de 10 segundos entre os pulsos, cada pulso com duração de 1×10^{-4} segundos. As células transfectadas foram transferidas no final do processo para garrafas de cultivo contendo 5 mL de M199 magic. A seleção com higromicina foi iniciada após 24 horas da eletroporação, em uma concentração de 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Foram utilizados dois controles na transfecção, um submetido a eletroporação, sem adição de DNA, e outro que não passou por eletroporação e não recebeu DNA, ambos os controles foram submetidos a seleção por higromicina. Após a seleção, a linhagem foi repicada conforme confluência, visando a expansão celular para posterior extração de DNA e congelamento.

O DNA da linhagem selecionada *L. infantum* Cas9T7 foi extraído pelo kit Genomic DNA Purification System (Promega) e sua construção foi confirmada através de PCR com primers específicos para o gene da nuclease Cas9. Os primers utilizados foram: Primer Forward: CATCGTGGACGAGGTGGCCT, e Primer Reverse: GAGGGCCACGTAGTAGGGG. Esta linhagem foi utilizada para a realização dos nocautes dos genes de interesse. Extratos celulares foram submetidos a *western blotting* revelados com anti-FLAG para identificação de Cas9-FLAG (dados não mostrados).

3.3 Geração de mutantes nulos dos genes alvos

A linhagem *L. infantum* Cas9T7 foi utilizada para a geração dos mutantes nulos e inserção da sequência de *barcode* única para os seguintes genes: *LinfFlp1* (LINF_240015400), *LinfFlp2* (LINF_150014400), *LinfFlp3* (LINF_140018100), *LinfFlp4* (LINF_330019800), *LinfFlp5* (LINF_340019100), *LinfFlp6* (LINF_360032300), *LinfNEDD8* (LINF_340026400), *LinfLTN1* (LINF_240007700), *LinfKLHDC10* (LINF_240027100), *LinfPirh2* (LINF_090009200), *LinfHLTF* (LINF_280024600).

Os primers específicos para os nocautes foram desenhados utilizando a ferramenta *online* disponível em [LeishGEdit](http://www.leishgedit.net/Home.html) (<http://www.leishgedit.net/Home.html>), inserindo os identificadores dos genes alvos. Os primers utilizados estão representados na Tabela 1.

Tabela 1: Primers utilizados para knockout dos genes deste trabalho que estão, disponíveis no site [LeishGEdit](http://www.leishgedit.net). As letras maiúsculas representam as respectivas regiões de homologia no gene alvo, enquanto as maiúsculas correspondem as sequências de anelamento no vetor *template* na reação de PCR. Fonte: autoria própria.

<i>Primers</i>	<i>Sequence (5'- 3')</i>
FLP1_barseq_UFP	CCGCCACTCTCCTTCTCCTTCCCCTCCCCgtgtatcggatgctc agttgcTCGTTACCGTCATGTCTgtataatgcagacctgctgc
FLP1_DRP	ATACACGTGCAGAGCAACGCGACACAGAGTccaatttgaga gacctgtgc
FLP1_5sgRNA	gaaattaatacgcactcactataggACCTTCCAGTCGTCTATCAGgtttta gagctagaaatagc
FLP1_3sgRNA	gaaattaatacgcactcactataggGGTGGCCCAAGCCTCACTTAgtttt agagctagaaatagc
FLP2_barseq_UFP	ATGGAGACACGGGCGCAGGAACGCACAGCCgtgtatcggat gtcagttgcCGGGTGTGGGACCTTTgtataatgcagacctgctgc
FLP2_DRP	GTGCTTATGAGCTCACTATTGCAATGCGCGccaatttgagag acctgtgc
FLP2_5sgRNA	gaaattaatacgcactcactataggCTCGGGAGAAGTATTGTGGAgtttt agagctagaaatagc
FLP2_3sgRNA	gaaattaatacgcactcactataggCCCCCTCCCGAACTTGATGAgtttta gagctagaaatagc
FLP3_barseq_UFP	TCTGCGGCTGCGTCCGCCTCTCGGCGGGCAgtgtatcggatg tcagttgcTCGATGCCCCGATCACCgtataatgcagacctgctgc
FLP3_DRP	CGCAACACGCTCTTGTGCGAGGAGCGCATTCccaatttgagag acctgtgc
FLP3_5sgRNA	gaaattaatacgcactcactataggATCGGCGACAACGAGCCATCgtttt agagctagaaatagc
FLP3_3sgRNA	gaaattaatacgcactcactataggTTTACATCTGCAGCACCCAAgtttta gagctagaaatagc
FLP4_barseq_UFP	GAGCGTGGGTCCGCTCTTCTCGCTCCTACGgtgtatcggatg cagttgcCTTATAGGTCTTTTCGGGgtataatgcagacctgctgc
FLP4_DRP	CGCGTGGTGTGTTGCCTTCCGCTCGTTTTTccaatttgagaga cctgtgc
FLP4_5sgRNA	gaaattaatacgcactcactataggTAAGCGGTTGTTGGCCGTTGgtttta gagctagaaatagc
FLP4_3sgRNA	gaaattaatacgcactcactataggGTGAATAGAATGGATGTGGCgtttt agagctagaaatagc
FLP5_barseq_UFP	GCACTGCACCAAATAGAGGCGGTCTTTGCGgtgtatcggatg tcagttgcGCATACCTACTACTGAGgtataatgcagacctgctgc
FLP5_DRP	CAAAGGGCAAGGGAGAAGGACTGAATGGCCccaatttgag agacctgtgc
FLP5_5sgRNA	gaaattaatacgcactcactataggGTAGGTGCCTCTCGATCCGCgtttta gagctagaaatagc
FLP5_3sgRNA	gaaattaatacgcactcactataggCCACGTTGGCAAGCCATAAAgtttt agagctagaaatagc

FLP6_barseq_UFP	CATCGCGCCTCCCCATCCATAACCACCTCAgtgtatcggatg cagttgcCGATAGCGGTGTCATTAgtataatgcagacctgctgc
FLP6_DRP	AACAGCAGTCTCGACTCCGGCACATGAATGccaatttgaga gacctgtgc
FLP6_5sgRNA	gaaattaatcagactcactataggTCCAGCGAGGTATGCGCTAAgtttt agagctagaaatagc
FLP6_3sgRNA	gaaattaatcagactcactataggAAATGAGTGCACGGTGCCTGgtttt agagctagaaatagc
LTN1_UFP	CCCCCCCCCCCCACACCACCACCACCACCggtgtatcggatg tcagttgcAGGTTACGATAAAGGTCgtataatgcagacctgctgc
LTN1_DRP	TGCCGTCCCGCACTTCATCAGTGTTCGccaatttgagaga cctgtgc
LTN1_5sgRNA	gaaattaatcagactcactataggAAAAAACGAAGGGGGCAGTGgtttt tagagctagaaatagc
LTN1_3sgRNA	gaaattaatcagactcactataggTGTGATTGTGCACATAAACGgtttt agagctagaaatagc
Pirh2_UFP	GCTTTGTGCAGGGGAGGGGGTTCAGCTGCagtgtatcggat gtcagttgcGCGACTTTATGCTGACTgtataatgcagacctgctgc
Pirh2_DRP	GGAGGATGAGAGAGACCCTGCATCCATCCTccaatttgaga gacctgtgc
Pirh2_5sgRNA	gaaattaatcagactcactataggGGCGGACGACCACACCCTAggtttt agagctagaaatagc
Pirh2_3sgRNA	gaaattaatcagactcactataggGATCACGGCGGCATGTCAAgtttt agagctagaaatagc
KLHDC10_UFP	GTGTGTGTGAAAGAGGGGGAGAGCGCCACCgtgtatcggat gtcagttgcTTACACCTAACCCGCCTgtataatgcagacctgctgc
KLHDC10_DRP	GTGCACATCAGATCAAACATGCACATATAccaatttgaga gacctgtgc
KLHDC10_5sgRNA	gaaattaatcagactcactataggATCACCACCCTCGCTGTAGTgtttta gagctagaaatagc
KLHDC10_3sgRNA	gaaattaatcagactcactataggTAATCTGTGCAGATAGGTATgtttta gagctagaaatagc
HLTF_UFP	TGAGTTTGGCTGCTGTTGCCGACGAAGAAGgtgtatcggatg tcagttgcGCGGCGATGGATCCTAAgtataatgcagacctgctgc
HLTF_DRP	AAACAGAGAGTGCAGATATATACATATATAccaatttgaga gacctgtgc
HLTF_5sgRNA	gaaattaatcagactcactataggAAGCCTTCCGTCACACCCTAggtttta gagctagaaatagc
HLTF_3sgRNA	gaaattaatcagactcactataggGGTGATGCTGGCTATCACAGgtttt agagctagaaatagc

Como parasita é diploide, é necessário garantir a deleção do gene em ambos os haplótipos. Para isso, utilizamos dois cassetes de reparo, cada um com marcadores de seleção distintos. Os vetores empregados na amplificação do cassete doador foram pT puro e pT blast, sendo então, as linhagens selecionadas com puomicina e blasticidina.

Para amplificação do cassete de reparo, os primers 1 e 2 (Figura 8) foram utilizados com os vetores pT puro ou pT blast como *template* na reação de PCR. Para a amplificação dos sgDNAs de dupla fita, para transcrição *in vivo* dos sgRNA no parasita, é utilizado os primers 5' e 3' sgRNA específicos de cada gene, juntamente com a

sequência scaffold Cas9 para síntese do gRNA (AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTA TTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC). Na Figura 8, estão representadas as etapas até processo de transfecção e edição gênica, incluindo o desenho dos primers, a obtenção dos produtos de PCR e o mecanismo de edição gênica em *L. infantum* Cas9T7. A figura também ilustra a organização do *locus* gênico antes e após a edição, destacando as modificações promovidas pela inserção ou deleção gênica no genoma do parasita.

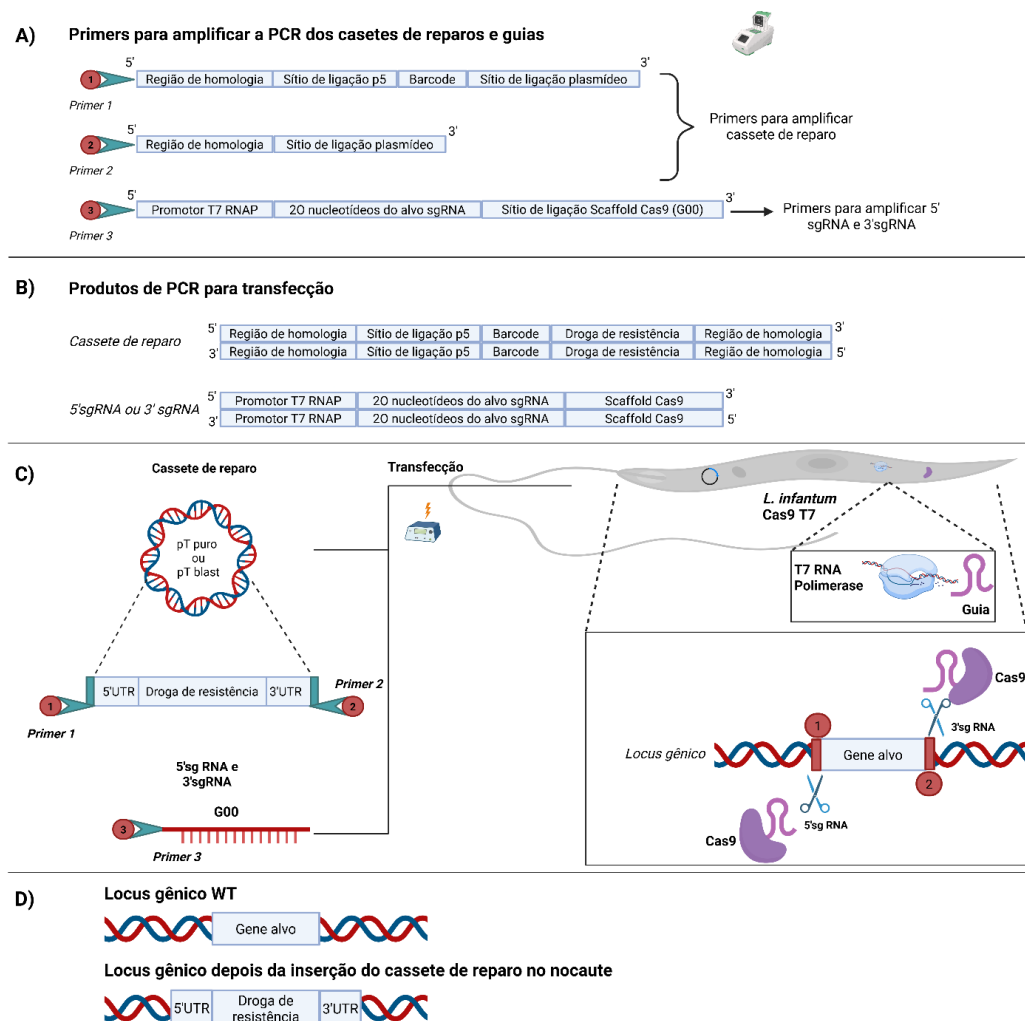


Figura 8: Metodologia de edição gênica por CRISPR Cas9 em *L. infantum*. A) Desenho dos primers utilizados para a amplificação dos cassetes de reparo e dos sgDNA. Os primers 1 e 2 são utilizados para gerar o cassete de reparo contendo regiões de homologia, sítios de ligação, *barcode* e marcador de resistência. O primer 3 é utilizado para amplificar os sgDNA, contendo o promotor T7, a sequência alvo e a estrutura scaffold necessária para a ligação da Cas9. B) Estrutura dos produtos de PCR após as rodadas de amplificação do cassete de reparo e os sgDNA. C) Representação esquemática da transfecção dos cassetes de reparo e dos sgDNA na linhagem *L. infantum* Cas9T7. Nessa linhagem, a T7 RNA polimerase sintetiza os sgRNAs, que direcionam a endonuclease Cas9 ao locus gênico de interesse, promovendo cortes específicos nas regiões 5'UTR e 3'UTR. A maquinaria de recombinação homóloga da célula reconhece os

locais de quebra e incorpora o cassete de reparo, substituindo o gene alvo pelo marcador de resistência. **D)** Locus gênico selvagem (WT) antes da edição e sua configuração após a inserção do cassete de reparo, resultando na deleção do gene alvo por meio da edição gênica CRISPR Cas9. Fonte: Adaptado de Beneke et., al 2017. Criado em <https://BioRender.com>.

As reações de PCR e os ciclos para a amplificação do cassete doador e sgDNAs estão mostradas, respectivamente, na Tabela 2 e Tabela 3.

Tabela 2: Reação de PCR e ciclagem para amplificação dos cassetes de reparo. Fonte: Autoria própria.

Reação			Ciclagem	
		°C	Tempo	Ciclos
H ₂ O	p/ 50 µL			
Buffer CG (5X)	10 µL	98	30 s	1
dNTPs (10mM)	5 µL	98	10 s	
Primer_F (10 µM)	1 µL	68,7	30 s	40x
Primer_R (10 µM)	1 µL	72	2 min 15 s	
DNA <i>template</i>	1 µL	72	5 min	1
Phusion HF	0,5 µL	4	∞	1

Tabela 3: Reação de PCR e ciclagem para amplificação dos sgRNA. Fonte: Autoria própria.

Reação			Ciclagem	
		°C	Tempo	Ciclos
H ₂ O	p/ 50 µL			
Buffer CG (5X)	10 µL	98	30 s	1
dNTPs (10mM)	5 µL	98	10 s	
Primer_F (10 µM)	2,5 µL	60	30 s	35x
Primer_R (10 µM)	2,5 µL	72	30 s	
DNA <i>template</i>	1 µL	72	5 min	1
Phusion HF	0,5 µL	4	∞	1

Para utilização do cassete de reparo e sgDNAs, cada reação de PCR foi precipitada adicionando 0,2 volumes finais de acetato de sódio 3M e 3 volumes finais de etanol absoluto. As amostras foram deixadas overnight a -20°C. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 30 min a 16.900 x g. Em seguida o sobrenadante foi descartado o *pellet* lavado com 1 mL de etanol 70%, seguido de uma nova centrifugação a 4°C por 20 min a 16.900 x g. O pellet obtido foi seco e ressuspendido em 50 µL de H₂O milli-Q autoclavada, e a amostra foi aquecida a 94°C por 5 min.

Para a obtenção dos nocautes nulos, foram utilizados 1 x 10⁷ células por transfecção da linhagem *L. infantum* Cas9T7 na fase log de crescimento. As células foram centrifugadas a 1650 x g por 10 minutos a temperatura ambiente, descartado o sobrenadante e realizado a lavagem das células com tampão 3 x Tb-BSF (22,3 mM Na₂HPO₄, 7,6 mM NaH₂PO₄, 45 mM KCl e 75 mM HEPES e 450 mM Sacarose) e 1,5

mM de CaCl₂, e centrifugadas novamente nas mesmas condições. Após o fim da lavagem, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado no tampão 3 x Tb-BSF e 1,5 mM de CaCl₂. Posteriormente a centrifugação, as células ressuspensionadas foram homogenizadas com solução contendo 5 µg de cassetes de reparo e 2 µg de sgDNAs, e adicionadas em uma placa 96 poços para transfecção. Utilizamos o sistema de eletroporação ECM 830 Square Wave (BTX) em três pulsos de 1,5 kV, com intervalos de 10 segundos entre os pulsos, cada pulso com duração de 1×10⁻⁴ segundos. As células transfectadas foram transferidas no final do processo para uma placa de 12 poços contendo 2 mL de M199 magic, e adicionado o antibiótico de seleção após 24 h da eletroporação, sendo puromicina à 120 µg/mL e blasticidina à 60 µg/mL. Foram realizados dois controles da transfecção, um submetido a eletroporação, sem adição de DNA, e outro que não passou por eletroporação e não recebeu DNA, ambos os controles foram submetidos aos antibióticos de seleção. Após a seleção, as linhagens viáveis foram transferidas para garrafas de cultivo contendo 5 mL de meio M199 Magic, visando a expansão celular para posterior extração de DNA e congelamento.

3.4 Confirmação dos mutantes nulos viáveis de *L. infantum*

O DNA genômico das linhagens nocautes viáveis foram extraídos pelo *kit Genomic DNA Purification System (Promega)* e confirmado através de PCR com *primers* específicos para os marcadores de seleção puromicina e blasticidina (Tabela 5). Também foi confirmado a ausência do gene no nocaute, por meio de primers específicos para amplificação do seu respectivo gene (Tabela 4).

Tabela 4: Primers utilizados para verificação da presença ou a ausência dos respectivos genes nas linhagens nocautes de *L. infantum*. Fonte: Autoria própria

<i>Primers</i>	<i>Sequence (5' – 3')</i>
FLP1_F	taataagcttatgcctgggccatc
FLP1_R	tcatgaattctcaatgccgacaatca
FLP2_F	ctataagcttatgaacggcaaagacgg
FLP2_R	caattctagactggtatccggagga
FLP3_F	atatcagaattcatgagcggcagtg
FLP3_R	aattcatctagacttctgatccagcaagatg
FLP4_F	atatcagaattcatgtcgacgtgggcc
FLP4_R	aattcatctagatcccccgagtccg
FLP5_F	atatcagaattcatggcgaacgtgccc
FLP5_R	aattcatctagacatccattttgaagcacctgtg
FLP6_F	atatcagaattcatgccgatagccgcc

FLP6_R	aattcatctagagccgcgtgatgctg
NEDD_F	atgaccttctcttttagcgtcatctct
NEDD_R	tcagcggcctgcacg
LTN1_F	atgtcccgcggtgtcaag
LTN1_R	agcacgccgcgtcg
Pirh2_F	atgaaatccttggccagggag
Pirh2_r	ccgcgatggaggcagtc
KLHDC10_F	atgcctgtccgacgcc
KLHDC10_R	gtatgccctataageggccaca
HLTF_F	atggaggacgtggatgcatttt
HLTF_R	tcgtaatcgtccacgctcg

Tabela 5: Primers utilizados para verificação da inserção dos genes de resistência nas linhagens nocautes de *L. infantum*. Fonte: Autoria própria.

<i>Primers</i>	<i>Sequence (5' – 3')</i>
Puromicina_F	atgactgaatacaagccaacggctc
Puromicina_R	ttaggctcccggcttacgtg
Blasticidina_F	atgcctttgtctcaagaagaatcca
Blasticidina_R	gccctcccacataaccag

3.5 Determinação da taxa de crescimento de promastigotas.

As culturas de promastigotas das linhagens nulas viáveis de *L. infantum* geradas, foram plaqueadas em triplicata, em placas de 12 poços, cada uma contendo 2×10^5 células/mL em 2 mL de meio M199 magic, com os respectivos antibióticos para cada linhagem. A taxa de crescimento dos promastigotas das linhagens nulas foi comparada à da linhagem *L. infantum* Cas9T7, sendo avaliada a cada 24h, por meio da contagem dos parasitas. Essa contagem foi realizada utilizando uma câmara de Neubauer, em microscópio invertido, durante 9 dias consecutivos, utilizando diluição de 1:100 das amostras em PBS 1X contendo 2% de formaldeído. As placas foram mantidas em incubadora a 27°C com 5% de CO₂. Os gráficos e a análise dos dados foram gerados pelo GraphPad Prism v8.0.2, utilizando o teste estatístico two-way ANOVA.

3.6 Efeito do nocaute gênico na proliferação celular

Para análise da proliferação celular, foi realizado um ensaio de Population Doubling (PD), onde as linhagens nocautes, foram plaqueadas em uma placa de 12 poços em triplicata, onde em cada poço foi adicionado 2 mL de M199 magic e o respectivo antibiótico de cada cepa com a quantidade de 2×10^5 células/mL. A taxa de proliferação celular das linhagens nocautes, produzidas nesse projeto, em comparação a linhagem *L.*

infantum Cas9T7 foi avaliada a cada 24 h, através da contagem do parasita, onde em cada dia, as linhagens foram re-plaqueadas em uma nova placa nas mesmas condições iniciais, coletando as células da placa do dia anterior.

A taxa de Population Doubling (PD) foi calculada por meio da fórmula:

$$PD = \log_2 \left(\frac{NTC}{2 \times 10^5} \right)$$

Onde *NTC* é o número total de células em cada dia avaliado. O crescimento (GR) acumulado no dia *n* foi obtido somando-se os valores de GRs diários da média da triplicata:

$$GR \text{ dia } n = GR \text{ dia } 1 + GR \text{ dia } 2 + \dots + GR \text{ dia } n$$

Os gráficos e análises estatísticas dos dados foram realizados utilizando o software GraphPad Prism v8.0.2, empregando o teste de two-way ANOVA para verificar diferenças estatísticas entre os grupos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito do nocaute dos genes *LinfFLPs* em *L. infantum*

Nosso grupo identificou e caracterizou seis proteínas com domínios F-box em *L. infantum*, denominadas LinfFlps (*Leishmania infantum* F-box Like proteins), cuja interação com LinfSkp1 foi validada (Correia et al., 2024). Para caracterizar funcionalmente estes genes, realizamos o nocaute deles por CRISPR-Cas9 em *L. infantum*. Para isso, os cassetes doadores para ambas marcações auxotróficas (resistência a antibióticos) e os DNAs guias foram amplificados por PCRs e os resultados podem ser verificados abaixo (Figuras 9A e B). Observamos amplificação específica do tamanho esperado para todos os fragmentos amplificados. Foram realizadas mais de uma reação para cada doador e guia para obtermos DNA suficiente para as transfecções.

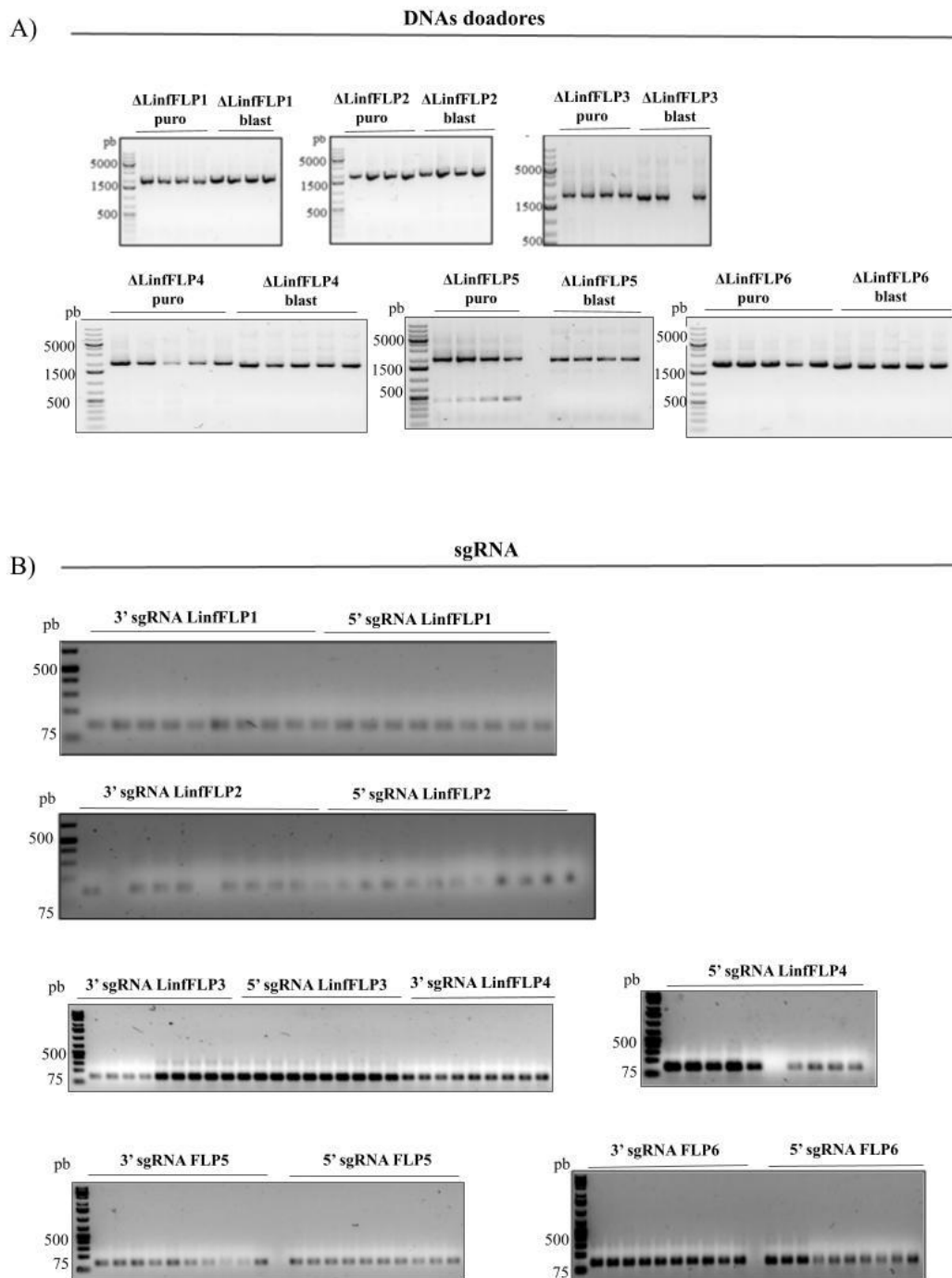


Figura 9: Amplificação cassetes de reparo e sgRNA para nocaute gênico por CRISPR-Cas9. A) Amplificação por PCR dos DNAs doadores contendo os cassetes de reparo destinados a geração das linhagens nocaute FLPs. Os cassetes de reparo referentes ao marcador de seleção puromicina apresentam bandas de aproximadamente 1870 pb, enquanto o cassete contendo o gene de resistência à blasticidina possui cerca de 1740 pb. **B)** Amplificação por PCR dos fragmentos de sgDNA utilizados para a transcrição *in vivo* dos sgRNA destinados a geração das linhagens nocaute FLPs, com bandas correspondendo a aproximadamente 150 pb. Fonte: Autoria própria

Após a transfecção e seleção das linhagens nocauteadas com os respectivos antibióticos, as cepas viáveis tiveram seu DNA extraído para avaliação do nocaute e

inserção do cassete de reparo com os marcadores auxotróficos de seleção por PCR. A Figura 10 apresenta a confirmação dos nocautes gênicos viáveis: $\Delta LinfFLP1$, $\Delta LinfFLP2$, $\Delta LinfFLP5$ e $\Delta LinfFLP6$ com a amplificação dos cassetes de reparo Puro e Blast apenas nas amostras nocaute e a amplificação do gene apenas na linhagem parental Ca9T7.

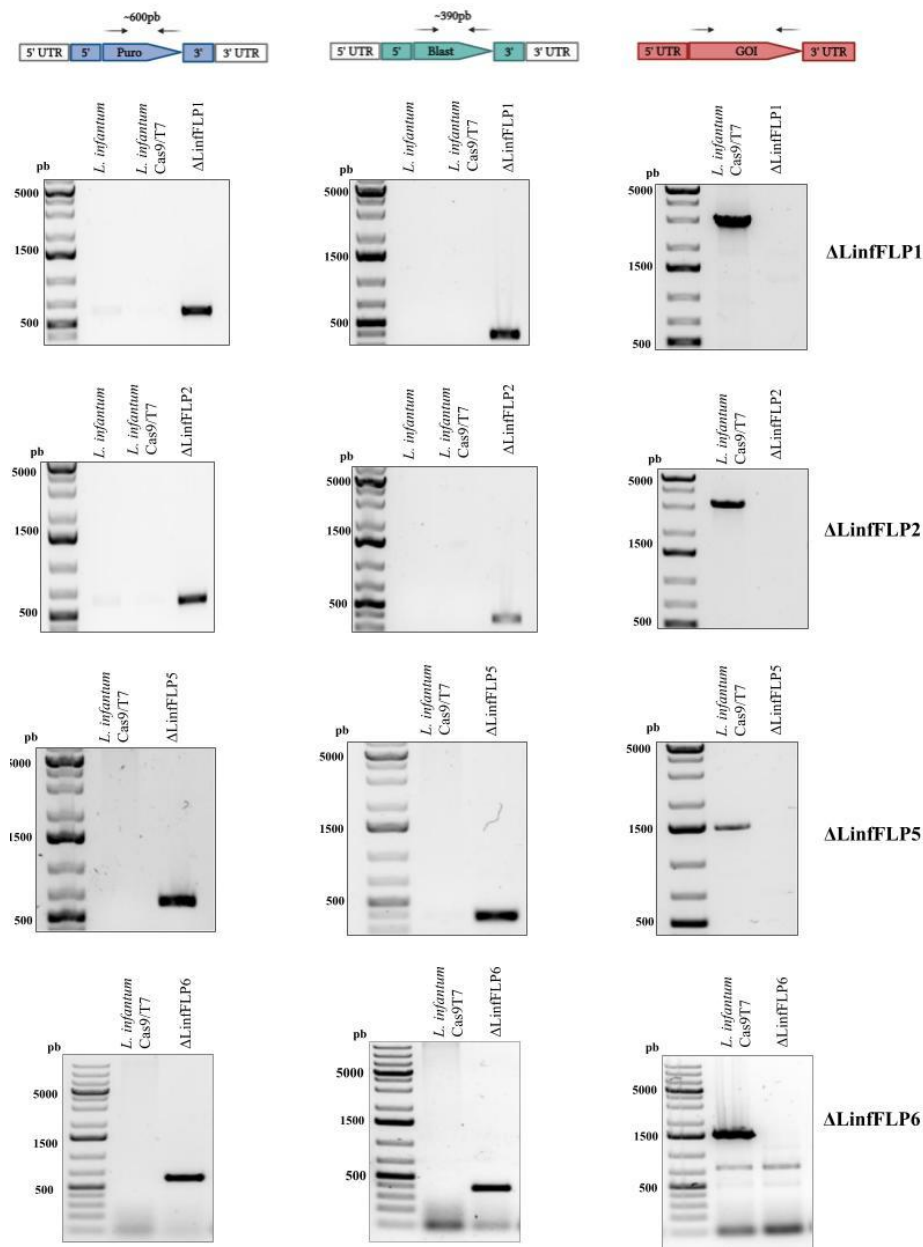


Figura 10: PCRs diagnósticas para validação das linhagens nocautes viáveis de *L. infantum* $\Delta FLP1::PUR/ \Delta FLP1::BLA$, $\Delta FLP2::PUR/ \Delta FLP2::BLA$, $\Delta FLP5::PUR/ \Delta FLP5::BLA$ e $\Delta FLP6::PUR/ \Delta FLP6::BLA$. Amplificação por PCR utilizada para confirmar a obtenção dos mutantes nulos viáveis das linhagens FLPs. A primeira coluna mostra a amplificação do gene marcador de resistência à puromicina, com banda de aproximadamente 600 pb; a segunda coluna mostra a amplificação do gene de resistência à blasticidina, com banda de aproximadamente 390 pb; e a terceira coluna demonstra a ausência de amplificação do gene alvo excisado nas linhagens nocaute, em comparação ao controle positivo que

ainda contém o gene. Os tamanhos esperados dos genes FLPs são: *LinFLP1*: 2946 pb, *LinFLP2*: 3123 pb, *LinFLP5*: 1428 pb e *LinFLP6*: 1482 pb. Fonte: Autoria própria

Para a linhagem nocaute de *LinFLP4*, obtivemos cepas viáveis após a seleção por puromicina e blasticidina, no entanto, ao realizar a PCR diagnóstica para confirmar a excisão do gene, observou-se a amplificação do *locus* gênico nesse nocaute, conforme mostrado na Figura 11, porém com uma menor intensidade de DNA amplificado. Para confirmar se houve um nocaute parcial com redução da expressão gênica, RT-PCR será necessário. Este resultado indica que as cepas geradas de *L. infantum* não são nocautes totais para *LinFLP4*, pois o parasita manteve o gene alvo. As transfecções foram realizadas em triplicata, mas os resultados foram consistentes. Se durante a seleção houve a deleção dos genes em ambos os alelos e esta linhagem não sobreviveu indicando que o gene seria essencial, deve ser investigado. Além disso, estes resultados sugerem que *LinFLP4* pode estar duplicado no genoma de *L. infantum*, embora as análises *in silico* demonstrem estar em cópia única. Essa diferença de resultado *in silico* e *in vitro*, pode estar relacionada à plasticidade genômica que esse parasita possui. *Leishmania* spp. são capazes de responder rapidamente a condições de estresse, por meio de alteração no número de cópias gênicas ou cromossômicas, geração de DNA extracromossômicos, entre outros mecanismos que conferem a adaptabilidade do seu genoma (Black et al., 2023).

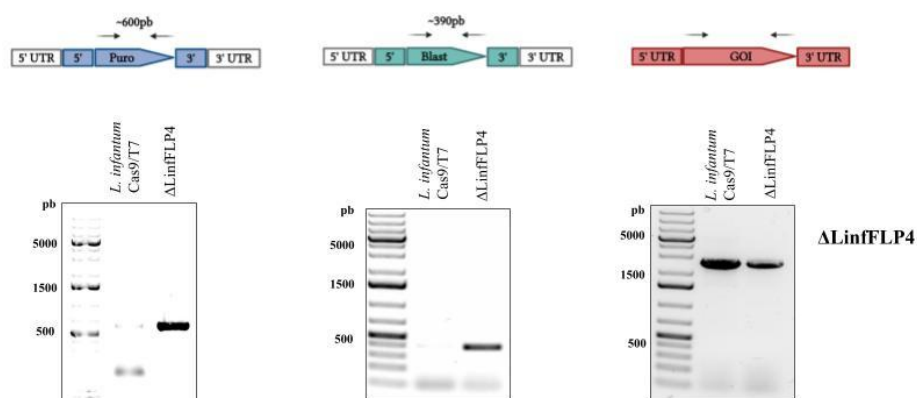


Figura 11: PCRs diagnóstica para validação da linhagem nocaute incompleto de *L. infantum* Δ FLP4::*PUR*/ Δ FLP4::*BLA*. A primeira coluna mostra a amplificação do gene marcador de resistência à puromicina, com banda de aproximadamente 600 pb; a segunda coluna mostra a amplificação do gene de resistência à blasticidina, com banda de aproximadamente 390 pb, confirmando a integração dos marcadores de resistência; e a terceira coluna evidencia a amplificação do gene *LinFLP4*, com tamanho esperado de 2412 pb, tanto na linhagem que deveria ser nocaute quanto no controle positivo. Esses resultados indicam que, apesar da inserção adequada dos marcadores de resistência, o gene alvo permanece presente, caracterizando um nocaute incompleto. Fonte: Autoria própria

Por outro lado, na linhagem $\Delta LinfFLP3$, duas transfecções não resultaram em cepas viáveis, enquanto, na terceira, a linhagem gerada manteve o gene alvo, sendo caracterizada como um nocaute incompleto. Decorrente as duas tentativas de transfecções onde não houve geração de linhagem viáveis, pode ser um indicativo que esse gene é necessário para alguma função celular vital no parasita. De forma consistente com esses achados, em *Trypanosoma brucei*, a deleção de determinadas proteínas F-box resultou em redução transitória do crescimento do parasita em alguns casos, e em outros levou à parada da divisão celular e morte rápida do organismo (Benz; Clayton, 2007). Esses dados indicam que alguns genes F-box estão envolvidos em funções essenciais em cinetoplastídeos.

4.1.1 Avaliação da taxa de crescimento de $\Delta LinfFLP1$, $\Delta LinfFLP2$, $\Delta LinfFLP5$ e $\Delta LinfFLP6$

Após a confirmação dos nocautes das linhagens viáveis $\Delta LinfFLP1$, $\Delta LinfFLP2$ e $\Delta LinfFLP5$, realizamos uma comparação de suas taxas de crescimento em comparação ao controle *L. infantum* Cas9T7. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa no crescimento das linhagens mutantes em comparação com o controle (Figura 12) indicando que o efeito da exclusão desses genes não afetou a proliferação da forma promastigota do parasita.

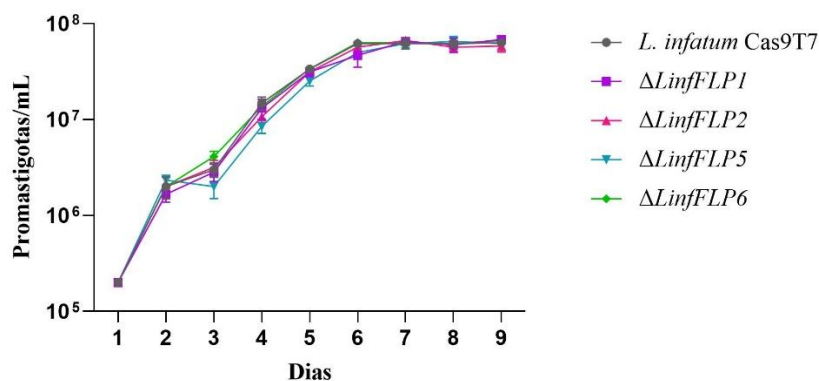


Figura 12: Perfil das curvas de crescimento das linhagens celulares *L. infantum* Cas9T7, $\Delta LinfFLP1$, $\Delta LinfFLP2$ e $\Delta LinfFLP5$ durante 9 dias. A linhagem controle *L. infantum* Cas9T7 (cinza), $\Delta LinfFLP1$ (roxo), $\Delta LinfFLP2$ (rosa), $\Delta LinfFLP5$ (azul) foram acompanhadas por nove dias através de contagem dos promastigotas. Os dados representam a média de promastigotas/mL, com barras de erro indicando desvio padrão entre as triplicatas. Fonte: Autoria própria.

4.3 Efeitos do nocaute do gene *LinfNEDD8*

A nedilação é uma modificação pós-traducional fundamental para a manutenção da estrutura e atividade do complexo CRL1 em *H. sapiens*. Nosso grupo identificou um gene similar a *NEDD8* de *H. sapiens* no interactoma de *LinfSkp1* e *LinfCul1* (Correia et al., 2024). O gene denominado *LinfNEDD8* foi nocauteado em *L. infantum* para avaliar sua função no parasita. Os cassetes doadores e de reparo foram amplificados por PCR gerando bandas do tamanho esperado (Figura 13). Foram realizadas 4 reações de PCR para cada doador e guia para obtenção da quantidade de DNA necessária para transfecção.

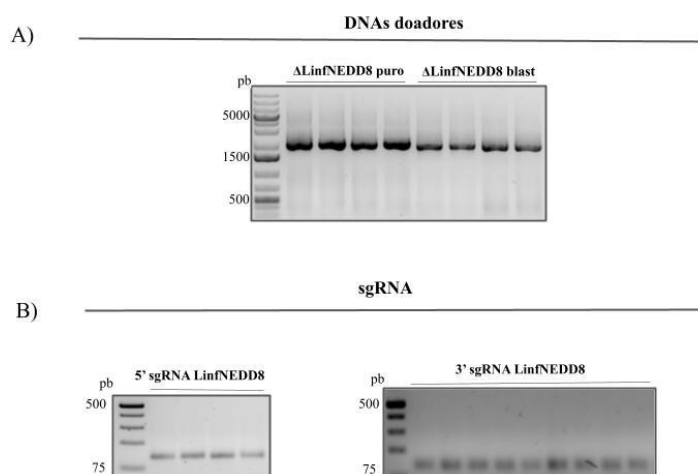


Figura 13: Amplificação dos cassetes de reparo e sgRNA para nocaute gênico por CRISPR-Cas9. A) Amplificação por PCR dos DNAs doadores contendo os cassetes de reparo destinados a geração da linhagem nocaute *LinfNEDD8*. Os cassetes de reparo referentes ao marcador de seleção puromicina apresentam bandas de aproximadamente 1870 pb, enquanto o cassete contendo o gene de resistência à blasticidina possui cerca de 1740 pb. **B)** Amplificação por PCR dos fragmentos de sgDNA, com tamanho aproximado de 150 pb, utilizados para a transcrição *in vivo* dos sgRNA destinado a geração da linhagem nocaute *LinfNEDD8*. Fonte: Autoria própria.

Não foi possível obter mutantes nulos após seleção com os antibióticos em três tentativas distintas de transfecção, indicando que esses genes podem ser essenciais para a sobrevivência do parasita. Foi realizada a tentativa de obtenção de um *single* nocaute do gene *LinfNEDD8*, com o objetivo de avaliar a redução de sua expressão e o consequente efeito sobre o parasita. No entanto, durante a etapa de confirmação da linhagem gerada, foi detectada contaminação em algum componente da reação de PCR, evidenciada pela presença de uma banda inespecífica de aproximadamente 234 pb, no controle negativo, correspondente ao tamanho esperado do gene, conforme mostrado na Figura 14.

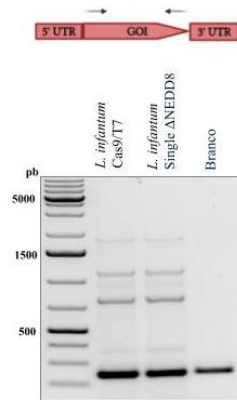


Figura 14: Confirmação do single nocaute da *LinfNEDD8*. Observa-se uma banda intensa entre 300 e 200 pb, compatível com o tamanho esperado do fragmento amplificado de 234 pb correspondente a *LinfNEDD8*. Fonte: Autoria própria.

Mesmo com a confirmação por PCR diagnóstica sugerindo a presença do gene no controle negativo, continuamos com a caracterização fenotípica por meio da curva de crescimento e da taxa de proliferação (Figura 15). Observamos que a linhagem *L. infantum* single $\Delta LinfNEDD8$ apresentou uma redução significativa no crescimento ao longo dos dias, tanto na densidade celular quanto no número de populações duplicadas (PD). Esse fenótipo indica que a potencial diminuição de *LinfNEDD8* compromete a capacidade de duplicação do parasita, sugerindo um impacto direto na regulação de processos essenciais para a sua proliferação.

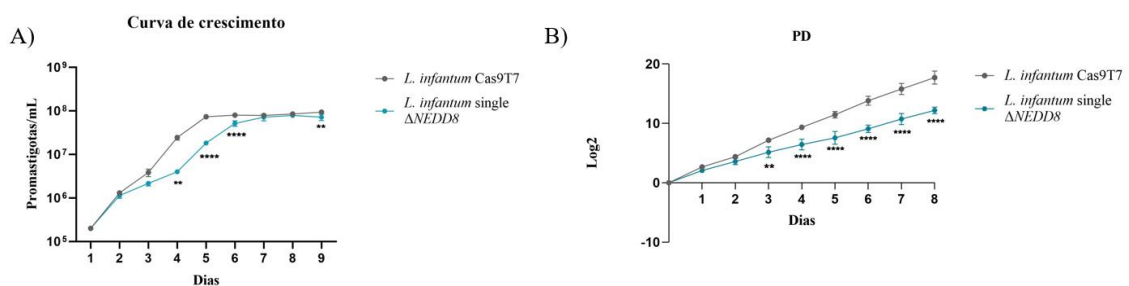


Figura 15: Curva de crescimento e taxa de proliferação entre as linhagens celulares *L. infantum* Cas9T7 e *L. infantum* single $\Delta NEDD8$ durante 9 dias. A) Curva de crescimento entre *L. infantum* Cas9T7 e *L. infantum* single $\Delta NEDD8$. B) Taxa de proliferação entre *L. infantum* Cas9T7 e *L. infantum* single $\Delta NEDD8$. Fonte: Autoria própria.

De forma consistente com esses achados, nossos resultados em *L. infantum* demonstram que o nocaute total ou parcial do gene *LinfNEDD8* compromete severamente a viabilidade celular. A inviabilidade observada no nocaute, juntamente com a função observada em outros cinetoplastídeos, sugere que a nedilação também é essencial para a

manutenção das vias regulatórias mediadas por CRLs nesse parasita, destacando a conservação funcional desse sistema entre cinetoplastídeos. Esses dados reforçam o papel crítico da NEDD8 na biologia do parasita e apontam esse componente como um potencial alvo para intervenções terapêuticas. De fato, a comparação das sequências e estruturas de da NEDD8 de *H. sapiens* e LinfNEDD8 demonstram a similaridade estrutural sugerindo relação funcional (Figuras 16A e B).

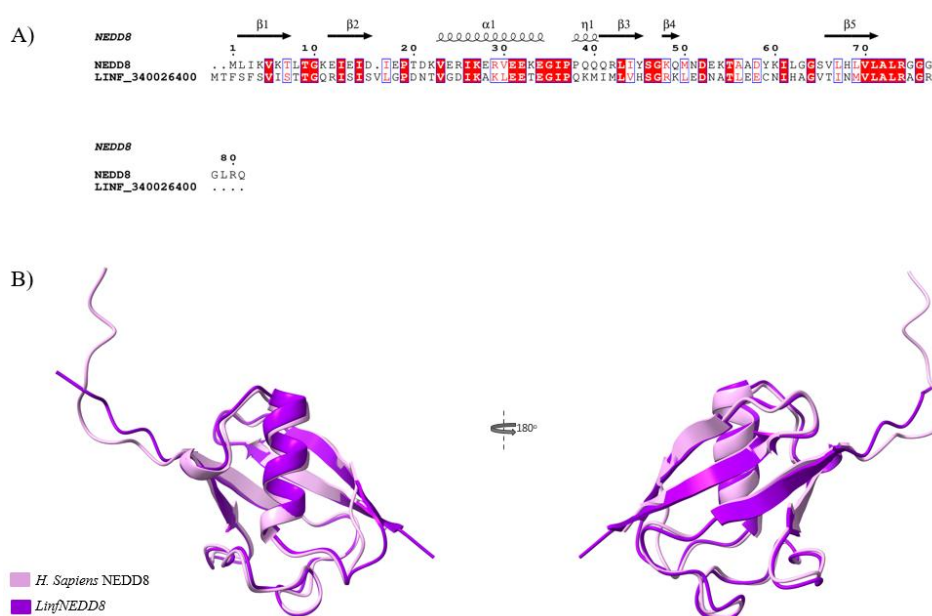


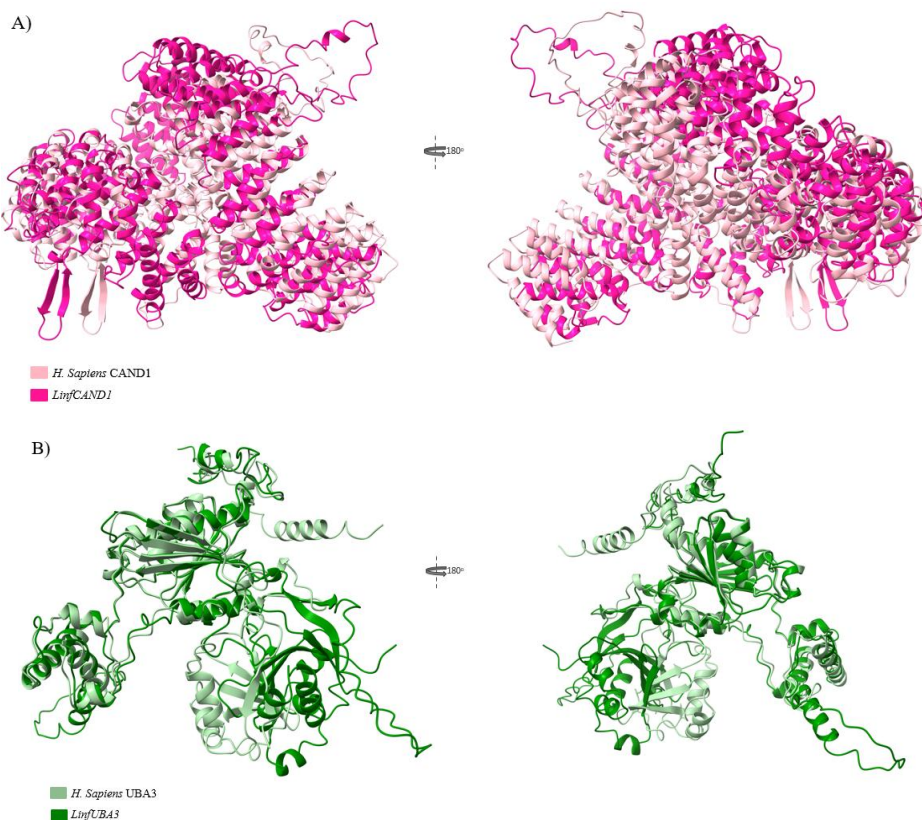
Figura 16: Análise da sequência de aminoácidos e estrutura proteica da NEDD8 e LinfNEDD8. A) Alinhamento da sequência de aminoácidos de NEDD8 de *H. sapiens* (Uniprot: Q15843) de LinfNEDD8 (Uniprot: A4IAM5), realizada por Clustal Omega (EMBL-EBI; Institute,). **B)** Alinhamento estrutural de NEDD8 (lilás) e LinfNEDD8 (roxo) sobrepostas realizadas AlphaFold (Cheng et al., 2023). A análise de RMSD trouxe valores de 0,759 Å. Fonte: Autoria própria.

Para avaliar a semelhança estrutural entre as proteínas, foi realizada uma análise da distância quadrática média (RMSD), que avalia a distância entre átomos correspondentes de duas estruturas (Torres, 2024). Valores nulos indicam estruturas idênticas, valores entre 0 e 2 Å, refletem alta identidade, enquanto valores acima de 2 Å, representam baixa semelhança (Torres, 2024). O RMSD obtido para o alinhamento entre NEDD8 humana e LinfNEDD8 foi de 0,759 Å, sugerindo alta identidade entre esses ortólogos.

Em *Trypanosoma brucei*, TbNEDD8 desempenha papel central nos processos de nedilação e na regulação do SUP (Liao et al., 2017). Estudos de interactoma identificaram

a associação de NEDD8 com proteínas Cullin, subunidades do complexos CRLs, reforçando seu papel na ativação dessas E3 ligases (Liao et al., 2017). Além disso, a redução de NEDD8 por RNAi resultou na perda global de ubiquitinação proteica e desencadeou múltiplos defeitos celulares, incluindo problemas na replicação do DNA e anormalidades na formação do flagelo, evidenciando sua relevância para a homeostase celular do parasita (Liao et al., 2017).

De maneira consistente, outros componentes do sistema de nedilação foram encontrados em análises *in silico*, apresentando alto índice de similaridade com as proteínas de *H. sapiens* (Figura 17). Dentre elas, destacam-se CAND1, que se associa aos complexos CRLs promovendo sua inativação ao impedir a ligação da NEDD8, assim como UBA3 e NAE1 que são subunidades da NAE (*NEDD8 Activation enzyme*) e a DCN1 like protein 5, uma E3 ligase, responsável pela transferência da NEDD8 ao substrato. Como observado na Figura 14, todas essas proteínas exibem valores de RMSD inferiores a 2 Å, reforçando a conservação desse sistema no parasita.



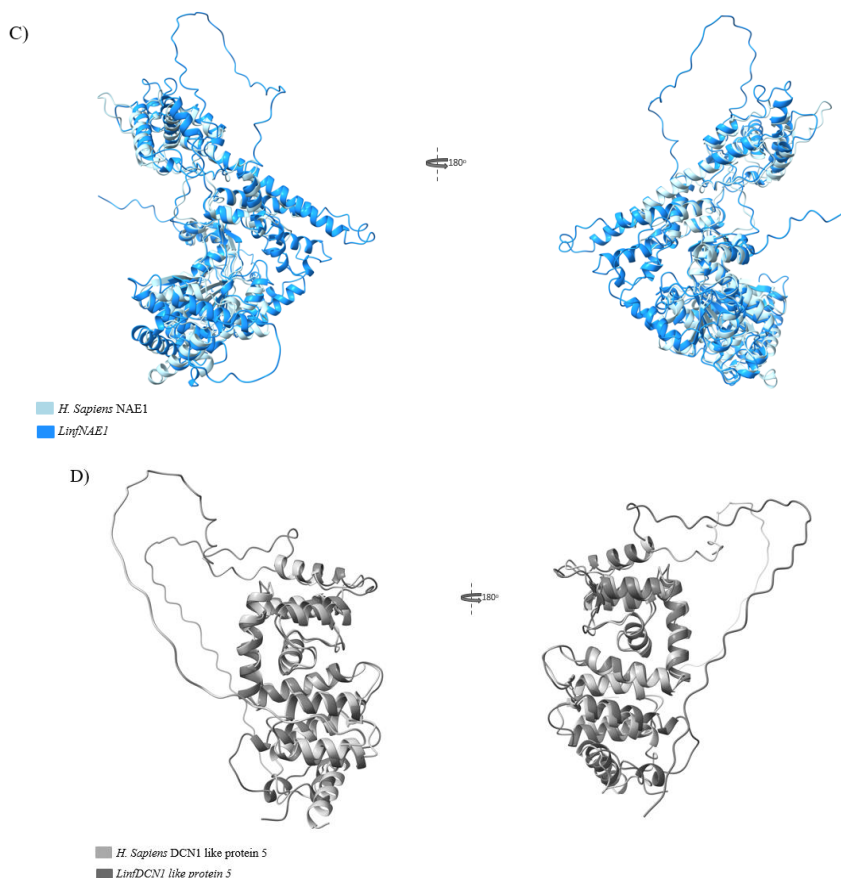


Figura 17: Estrutura proteica de CAND1, UBA3, NAE1 e DCN1 like protein 5 e seus ortólogos em *L. infantum*, realizadas AlphaFold (Cheng et al., 2023). A) Alinhamento estrutural de CAND1 (rosa claro) e *LinfCAND1* (rosa escuro) sobrepostas. A análise de RMSD trouxe valores de 1,223 Å. B) Alinhamento estrutural de UBA3 (verde claro) e *LinfUBA3* (verde) sobrepostas. A análise de RMSD trouxe valores de 0,880 Å. C) Alinhamento estrutural de NAE1 (azul claro) e *LinfNAE1* (azul) sobrepostas. A análise de RMSD trouxe valores de 1,130 Å. D) Alinhamento estrutural de DCN1 like protein 5 (cinza claro) e *LinfDCN1 like protein 5* (cinza escuro) sobrepostas. A análise de RMSD trouxe valores de 1,175 Å. Fonte: Autoria própria.

4.4 Efeito do nocaute dos genes relacionado ao RQC em *L. infantum*

Análises *in silico* dos genes de *L. infantum* ortólogos dos principais componentes envolvidos no sistema RQC de *H. sapiens* (LTN1, KLHDC10, Pirh2 e HLTF) revelou quatro genes que denominamos como *LinfLTN1*, *LinfKLHDC10*, *LinfPirh2* e *LinfHLTF*. Realizamos a amplificação dos cassetes doadores e guia revelando fragmentos dentro do tamanho esperado (Figura 18).

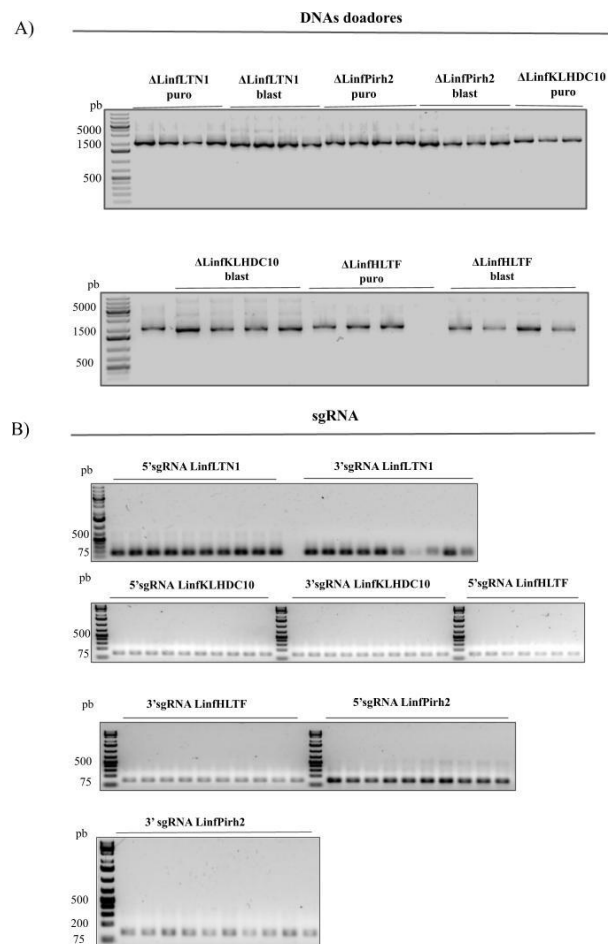


Figura 18: Amplificação dos cassetes de reparo e sgRNA para nocaute gênico por CRISPR-Cas9. A) Amplificação por PCR dos DNAs doadores contendo os cassetes de reparo destinados a geração das linhagens nocaute RQC. Os cassetes de reparo referentes ao marcador de seleção puromicina apresentam bandas de aproximadamente 1870 pb, enquanto o cassete contendo o gene de resistência à blasticidina possui cerca de 1740 pb. **B)** Amplificação por PCR dos fragmentos de sgDNA, com tamanho aproximado de 150 pb, utilizados para a transcrição *in vivo* dos sgRNA destinados a geração das linhagens nocaute RQC. Fonte: Autoria própria

Após transfecção e seleção, a linhagem $\Delta LinfKLHDC10$ não gerou mutantes nulos em três tentativas distintas de transfecção, sugerindo ser um gene essencial para a sobrevivência do parasita. Já para as linhagens $\Delta LinfLTN1$, $\Delta LinfPirh2$ e $\Delta LinfHLTF$, obtivemos cepas viáveis, que tiveram seu DNA extraído, com a confirmação por PCR dos cassetes marcadores de seleção dos antibioticos e a excisão do gene (Figura 19).

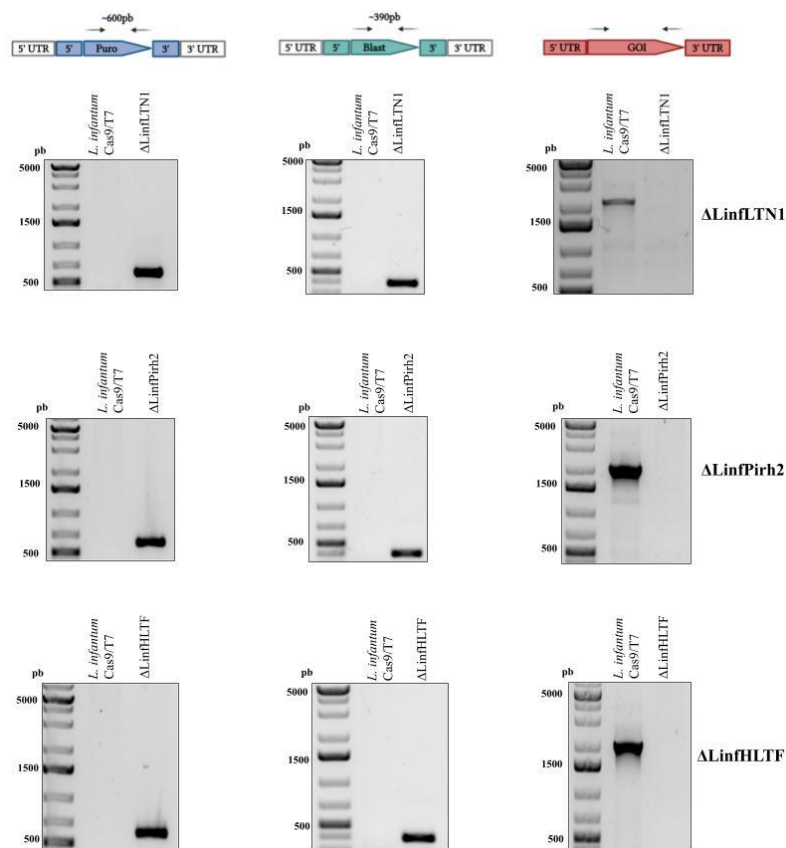


Figura 19: PCRs diagnósticas para validação das linhagens nocautes viáveis de *L. infantum* Δ LinfLTN1::PUR/ Δ LinfLTN1::BLA, Δ LinfPirh2::PUR/ Δ LinfPirh2::BLA e Δ LinfHLTF::PUR/ Δ LinfHLTF::BLA. Amplificação por PCR utilizada para confirmar a obtenção dos mutantes nulos viáveis das linhagens RQC. A primeira coluna mostra a amplificação do gene marcador de resistência a puromicina, com banda de aproximadamente 600 pb; a segunda coluna mostra a amplificação do gene de resistência a blasticidina, com tamanho aproximado de 390 pb, e a última coluna demonstra a ausência de amplificação do gene alvo excisado nas linhagens nocaute, em comparação ao controle positivo que ainda contém o gene alvo. Os tamanhos esperados dos genes das RQC são: *LinfLTN1*: 5385 pb, *LinfPirh2*: 2628 e *LinfHLTF*: 3798 pb. Para possibilitar a realização simultânea das PCRs de confirmação do gene excisado, foram desenhados primers visando amplificar fragmentos de aproximadamente 2000 pb, por esse motivo, as bandas observadas na imagem apresentam esse tamanho reduzido. Fonte: Autoria própria.

4.4. Avaliação da taxa de crescimento e proliferação das linhagens Δ LinfLTN1, Δ LinfPirh2, Δ LinfHLTF

Após a confirmação dos nocautes das linhagens Δ LinfLTN1, Δ LinfPirh2, Δ LinfHLTF, realizamos uma comparação da taxa de crescimento dos mutantes nulos viáveis com a linhagem controle *L. infantum* Cas9T7. Os resultados indicaram que não houve diferença significativa no crescimento populacional das linhagens Δ LinfPirh2 e Δ LinfHLTF em comparação com o controle (Figura 20), sugerindo que o efeito do

nocaute desses genes no genoma de *L. infantum*, não impactou na taxa de crescimento celular da forma promastigota do parasita. Por outro lado, a linhagem $\Delta LinfLTN1$ exibiu redução significativa de crescimento nos dias 3, 4, 5 e 6, seguida de uma recuperação nos dias 8 e 9, quando atingiu a mesma quantidade de células que o controle. Esse comportamento pode estar relacionado à ausência da *LinfLTN1*, responsável pela ubiquitinação de substratos quando a subunidade 60S está estagnada, levando a um acúmulo de proteínas mal sintetizadas. Essa condição pode exigir uma fase de adaptação antes que o parasita retome seu crescimento normal.

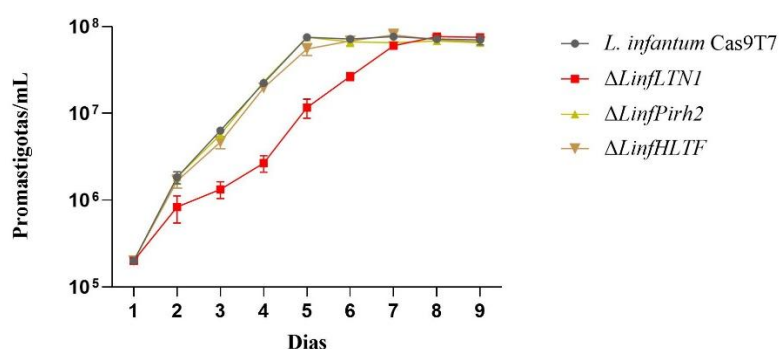


Figura 20: Curva de crescimento entre as linhagens celulares *L. infantum* Cas9T7, $\Delta LinfLTN1$, $\Delta LinfPirh2$, $\Delta LinfHLTF$ durante 9 dias. A linhagem controle *L. infantum* Cas9T7 (cinza), $\Delta LinfLTN1$ (vermelha), $\Delta LinfPirh2$ (amarelo), $\Delta LinfHLTF$ (marrom). Os dados representam a média de promastigotas/mL, com barras de erro indicando desvio padrão entre as triplicatas. Fonte: Autoria própria.

Para analisar a taxa de crescimento dessas linhagens foi realizado o ensaio de Population Doubling (PD), que avalia a capacidade da linhagem se duplicar diariamente. O nocaute $\Delta LinfLTN1$ apresentou menor número de duplicação em comparação com o controle, corroborando com os dados da curva e mostrando um papel essencial na divisão celular do parasita (Figuras 21A e B). Interessantemente, as análises de PD das linhagens $\Delta LinfPirh2$ e $\Delta LinfHLTF$ demonstraram diferenças significativas com relação a linhagem controle, sugerindo que embora estas linhagens consigam atingir a mesma densidade do controle, elas crescem mais lentamente (Figuras 21C e D). Esses resultados sugerem que, embora os mutantes apresentem menor taxa de proliferação quando cultivados em meio novo e com baixa densidade celular, o crescimento em cultura contínua parece compensar parcialmente esse efeito. Assim, é possível que, em condições de maior densidade, fatores secretados pelo próprio parasita favoreçam a adaptação e atenuem o impacto da ausência gênica.

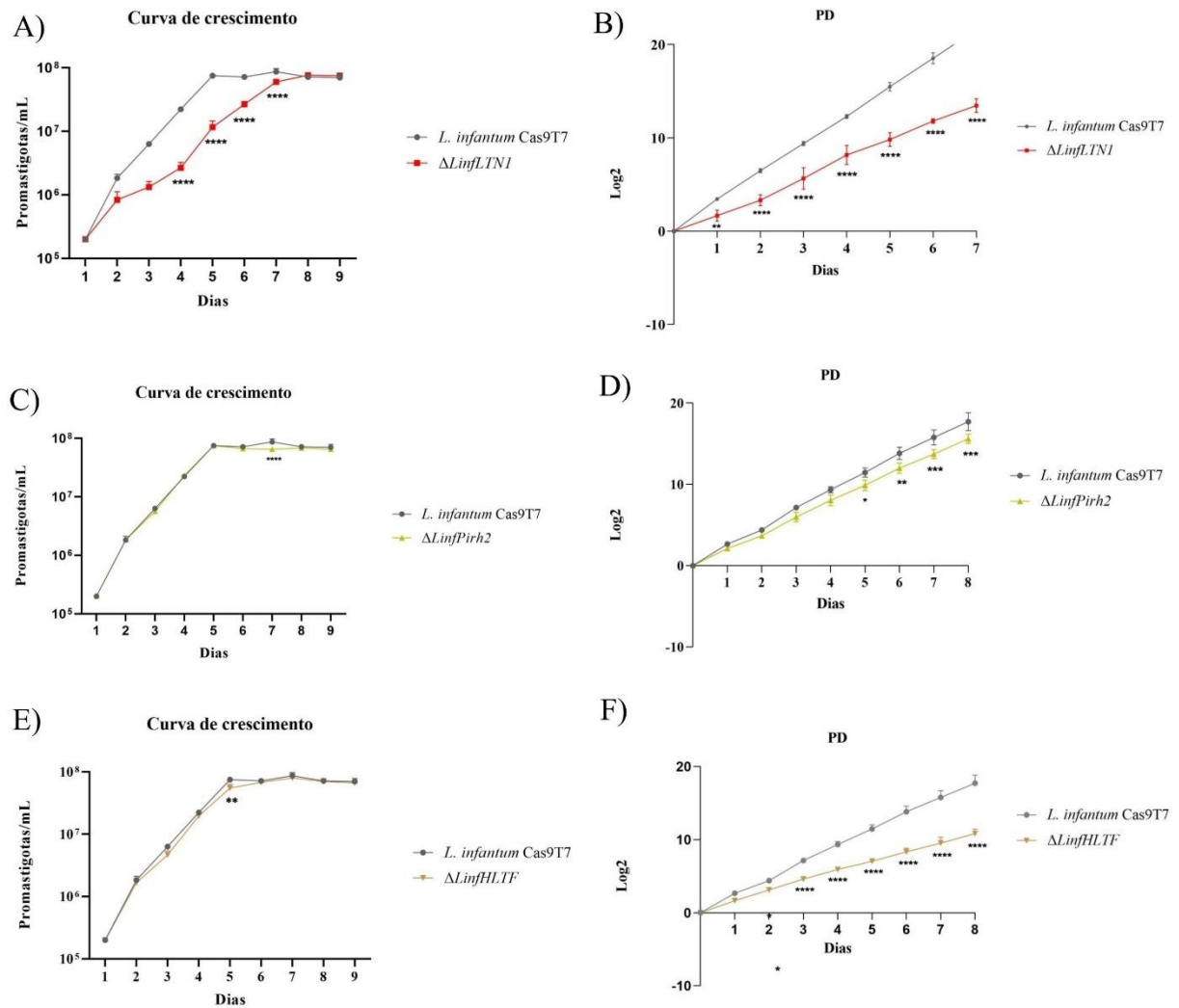
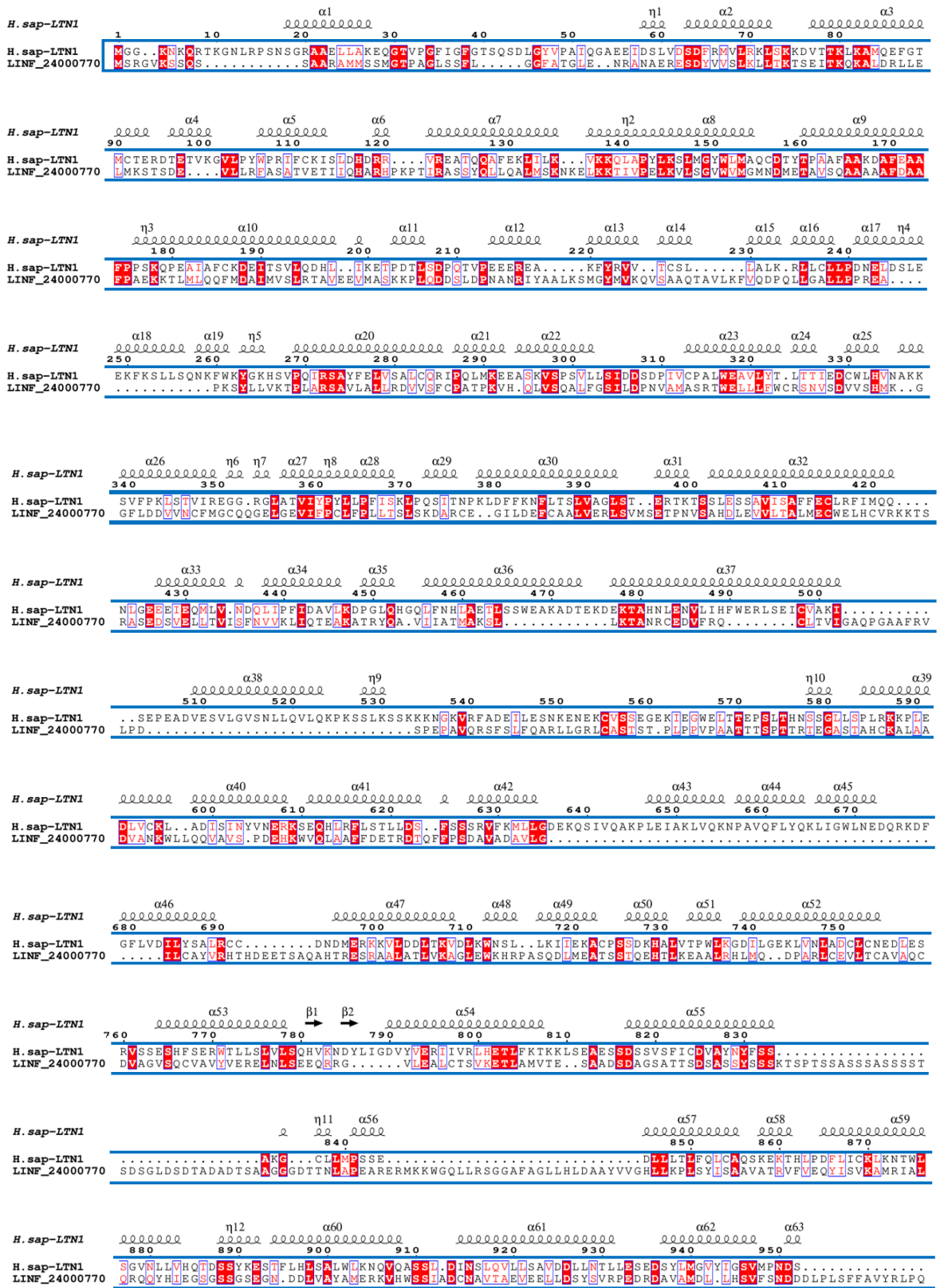


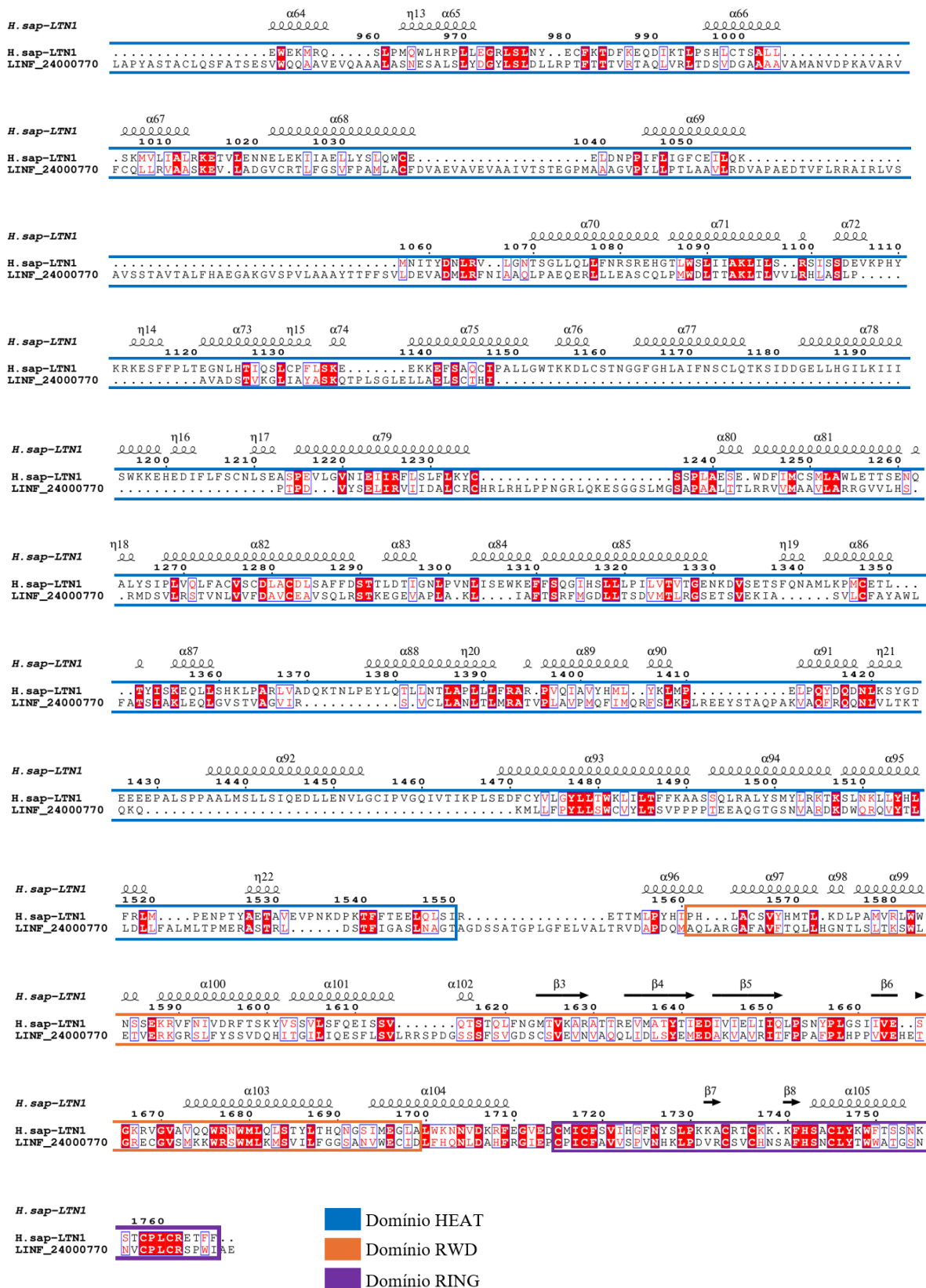
Figura 21: Curva de crescimento e taxa de proliferação entre as linhagens celulares *L. infantum* Cas9T7, $\Delta LinLTN1$, $\Delta LinPirh2$, $\Delta LinHLTF$ durante 9 dias. **A)** Curva de crescimento entre *L. infantum* Cas9T7 e $\Delta LinLTN1$. **B)** Taxa de proliferação entre *L. infantum* Cas9T7 e $\Delta LinLTN1$. **C)** Curva de crescimento entre *L. infantum* Cas9T7 e $\Delta LinPirh2$. **D)** Taxa de proliferação entre *L. infantum* Cas9T7 e $\Delta LinPirh2$. **E)** Curva de crescimento entre *L. infantum* Cas9T7 e $\Delta HLTf$. **F)** Taxa de proliferação entre *L. infantum* Cas9T7 e $\Delta HLTf$. Gráficos avaliados pelo teste estatístico two-way ANOVA onde: ** = $P < 0.01$ *** = $P < 0.001$. Fonte: Autoria própria.

4.5 Análises estruturais das proteínas LTN1, KLHDC10 e NEDD8 de *H. sapiens* e os ortólogos em *L. infantum*

O alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas KLHDC10 e LTN1 de *H. sapiens* e *L. infantum* demonstrou uma identidade de 23,68% e 20,58% respectivamente (Figura 22).

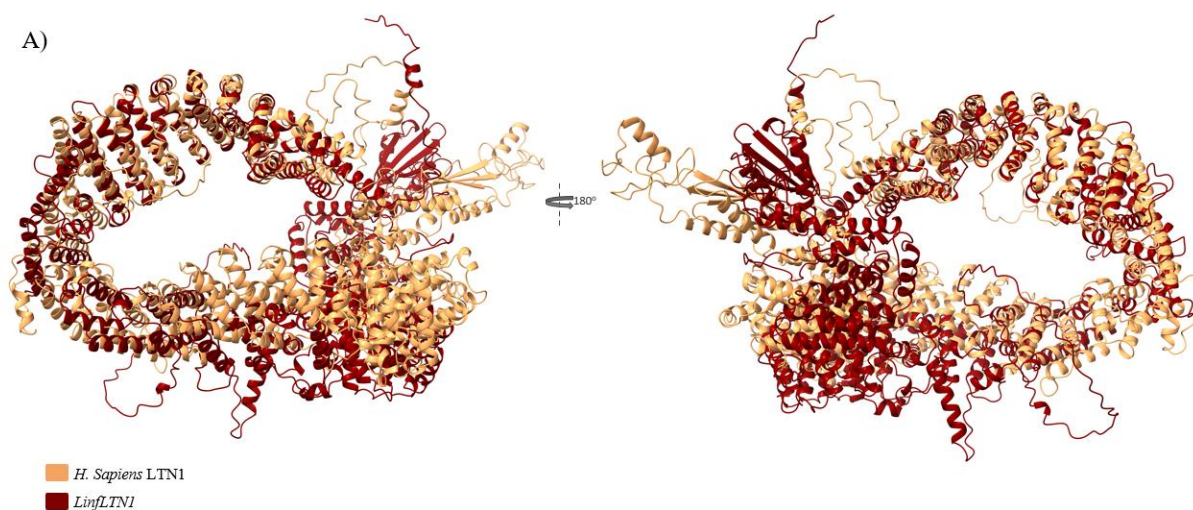
A)





Por sua vez, a proteína KLHDC10 reconhece *degrons* localizados na extremidade C-terminal que terminam em Trp-Gly, Pro-Gly ou Ala-Gly. Estruturalmente, apresenta um domínio β -hélice formado por seis repetições Kelch, flanqueado por um domínio tri-helicoidal no C-terminal composto pela BC-box e pela Cullin-2 box, regiões responsáveis pela interação com as proteínas adaptadoras Elongina B/C e com a Cullin 2, respectivamente (Patil et al., 2023).

A sobreposição estrutural das proteínas LTN1 e KLHDC10 de *H. sapiens* e de *L. infantum* por AlphaFold (Cheng et al., 2023), demonstrou que ambas as proteínas apresentam topologia estrutural semelhante com maior parte de suas estruturas sobrepostas (Figura 23A-B), apresentando valores de RMSD inferiores a 2 Å, reforçando a conservação delas. Estes resultados sugerem relação funcional entre as proteínas dos diferentes organismos arguindo para a possibilidade do sistema RQC existir no parasita. Assim, LinfLTN1 pode estar relacionado a sua função de ubiquitar substratos diversos em ribossomos estagnados durante a tradução no parasita. A proteína LinfKLHDC10, revela uma similaridade notável, embora com duas hélices orientados em sentidos opostos. Essa proteína, é parte do complexo CRL2 (Cullin2-RING ubiquitina ligases)-KLHDC10 em *H. sapiens*, o que sugere que um análogo desse complexo também pode estar presente no parasita.



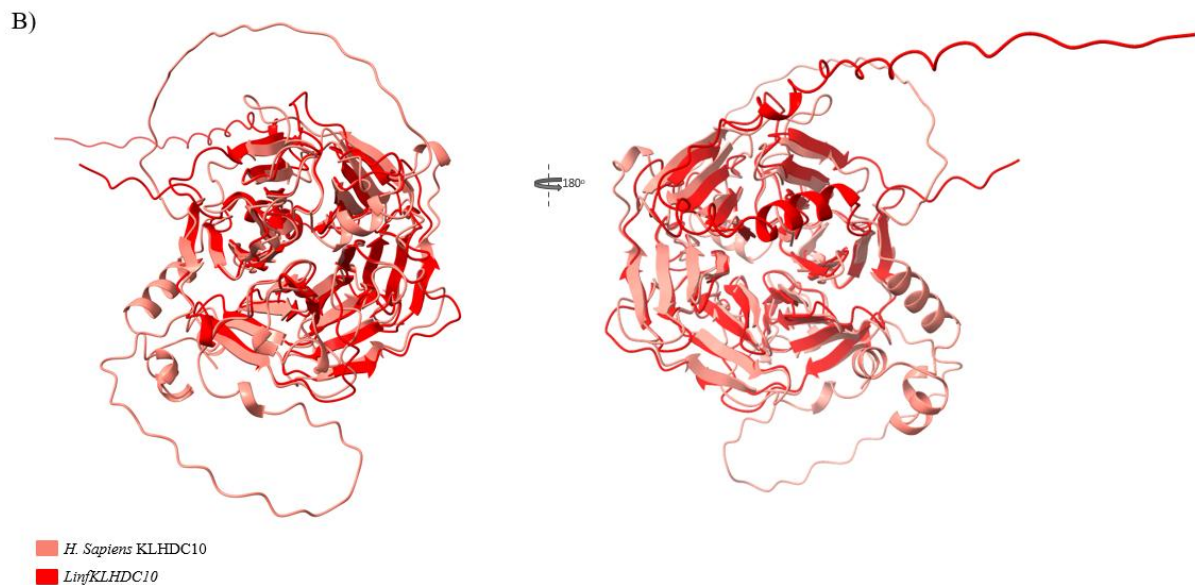


Figura 23: Alinhamento estrutural realizado por Alphafold (Cheng et al., 2023) das proteínas RQC de *L. infantum* e *H. sapiens*. A) Alinhamento estrutural da LTN1 (bege) e *Linf*LTN1 (marrom) sobrepostas. A análise de RMSD trouxe valores de 1,2 Å. B) Alinhamento estrutural de KLHDC10 (salmão) e *Linf*KLHDC10 (vermelho) sobrepostas. A análise de RMSD trouxe valores de 1,089 Å. Fonte: Autoria própria.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi realizada a geração de mutantes nulos para diferentes genes associados ao Sistema Ubiquitina-Proteassoma (SUP) em *Leishmania infantum*, com o objetivo de investigar a contribuição desse sistema para a biologia do parasita. As tentativas de nocaute gênico dos genes *LinfNEDD8*, *LinfKLHDC10* e *LinfFLP3* não resultaram em linhagens viáveis, indicando que esses genes desempenham funções e papel essencial para a sobrevivência do parasita.

Entre as linhagens viáveis obtidas, o mutante Δ *LinfLTN1* apresentou redução notável na taxa de crescimento em relação à linhagem parental. Além da Δ *LinfLTN1*, os demais nocautes do RQC, Δ *LinfPirh2* e Δ *LinfHLTF*, apresentaram taxa de duplicação menor, indicando participação desses genes na manutenção da capacidade replicativa do parasita.

As análises estruturais complementaram esses achados ao revelar alta similaridade entre os componentes do RQC e da nedilação de *L. infantum* e seus ortólogos humanos. Essa conservação sugere funcionalidade desses sistemas no parasita, alinhada ao que se conhece em outros eucariotos. Assim, a combinação entre resultados experimentais e

estruturais fortalecem a hipótese de que o SUP e o RQC constituem vias altamente conservadas e essenciais em *L. infantum*.

Os resultados obtidos reforçam a relevância do SUP na proliferação e viabilidade celular, ampliando o entendimento sobre o funcionamento do SUP e do RQC na biologia de *L. infantum*. A demonstração da essencialidade de genes como *LinfNEDD8*, *LinfKLHDC10* e *LinfFLP3*, além do impacto fenotípico observado nos mutantes de RQC, destaca esses componentes como potenciais alvos terapêuticos promissores, especialmente diante da necessidade de novas estratégias para o combate à leishmaniose. Pesquisas futuras deverão aprofundar a caracterização funcional desses genes e suas redes de interação, visando compreender de forma mais detalhada seus papéis nos processos celulares do parasita.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEDFORD, Lynn *et al.* Ubiquitin-like protein conjugation and the ubiquitin–proteasome system as drug targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 1, p. 29–46, jan. 2011.

BENEKE, Tom *et al.* A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids. **Royal Society Open Science**, v. 4, n. 5, p. 170095, 3 maio 2017.

BENZ, Corinna; CLAYTON, Christine E. The F-box protein CFB2 is required for cytokinesis of bloodstream-form *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 156, n. 2, p. 217–224, 1 dez. 2007.

BEST, Katharina *et al.* Structural basis for clearing of ribosome collisions by the RQT complex. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 921, 17 fev. 2023.

BLACK, Jennifer A. *et al.* Life in plastic, it's fantastic! How *Leishmania* exploit genome instability to shape gene expression. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, p. 1102462, 26 jan. 2023.

BURGE, Rebecca J.; MOTTRAM, Jeremy C.; WILKINSON, Anthony J. Ubiquitin and ubiquitin-like conjugation systems in trypanosomatids. **Current Opinion in Microbiology**, v. 70, p. 102202, 1 dez. 2022.

CDC - DPDx - Leishmaniose. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>>. Acesso em: 10 nov. 2025.

ÇETIN, Gonca *et al.* The Ubiquitin–Proteasome System in Immune Cells. **Biomolecules**, v. 11, n. 1, p. 60, jan. 2021.

CHEN, Ruey-Hwa; CHEN, Yu-Hsuan; HUANG, Tzu-Yu. Ubiquitin-mediated regulation of autophagy. **Journal of Biomedical Science**, v. 26, n. 1, p. 80, 21 out. 2019.

CHENG, Jun *et al.* Accurate proteome-wide missense variant effect prediction with AlphaMissense. **Science**, v. 381, n. 6664, p. eadg7492, 22 set. 2023.

CLAGUE, Michael J.; HERIDE, Claire; URBÉ, Sylvie. The demographics of the ubiquitin system. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 7, p. 417–426, 1 jul. 2015.

CORREIA, Camila Rolemberg Santana Travaglini Berti de *et al.* Functional characterization of Cullin-1-RING ubiquitin ligase (CRL1) complex in *Leishmania infantum*. **PLOS Pathogens**, v. 20, n. 7, p. e1012336, 17 jul. 2024.

DAMIANOU, Andreas *et al.* Essential roles for deubiquitination in *Leishmania* life cycle progression. **PLOS Pathogens**, v. 16, n. 6, p. e1008455, 16 jun. 2020.

EMBL-EBI; INSTITUTE, European Bioinformatics. **Job Dispatcher homepage | EMBL-EBI**. Disponível em: <<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/>>. Acesso em: 24 nov. 2025.

FILBECK, Sebastian *et al.* Ribosome-associated quality-control mechanisms from bacteria to humans. **Molecular Cell**, v. 82, n. 8, p. 1451–1466, 21 abr. 2022.

HARPER, J. Wade; SCHULMAN, Brenda A. Cullin-RING Ubiquitin Ligase Regulatory Circuits: A Quarter Century Beyond the F-Box Hypothesis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 90, n. Volume 90, 2021, p. 403–429, 20 jun. 2021.

HO, Margaret S.; TSAI, Pei-I.; CHIEN, Cheng-Ting. F-box proteins: the key to protein degradation. **Journal of Biomedical Science**, v. 13, n. 2, p. 181–191, 1 mar. 2006.

INADA, Toshifumi; BECKMANN, Roland. Mechanisms of Translation-coupled Quality Control. **Journal of Molecular Biology**, v. 436, n. 6, p. 168496, 15 mar. 2024.

JOAZEIRO, Claudio A. P. Mechanisms and functions of ribosome-associated protein quality control. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 6, p. 368–383, jun. 2019.

JUSZKIEWICZ, Szymon *et al.* ZNF598 Is a Quality Control Sensor of Collided Ribosomes. **Molecular Cell**, v. 72, n. 3, p. 469–481.e7, 1 nov. 2018.

KHAN, Abdul Q. *et al.* F-box proteins in cancer stemness: An emerging prognostic and therapeutic target. **Drug Discovery Today**, v. 26, n. 12, p. 2905–2914, 1 dez. 2021.

KHARE, Shilpi *et al.* Proteasome inhibition for treatment of leishmaniasis, Chagas disease and sleeping sickness. **Nature**, v. 537, n. 7619, p. 229–233, set. 2016.

KIPREOS, Edward T.; PAGANO, Michele. The F-box protein family. **Genome Biology**, v. 1, n. 5, p. reviews3002.1, 10 nov. 2000.

KOMANDER, David; CLAGUE, Michael J.; URBÉ, Sylvie. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 8, p. 550–563, ago. 2009.

KOMANDER, David; RAPE, Michael. The ubiquitin code. **Annual Review of Biochemistry**, v. 81, p. 203–229, 2012.

Leishmaniasis. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 20 maio. 2025.

LIAO, Shanhui *et al.* The Protein Neddylation Pathway in *Trypanosoma brucei*: FUNCTIONAL CHARACTERIZATION AND SUBSTRATE IDENTIFICATION *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 3, p. 1081–1091, 20 jan. 2017.

LYUMKIS, Dmitry *et al.* Structural basis for translational surveillance by the large ribosomal subunit-associated protein quality control complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 45, p. 15981–15986, 11 nov. 2014.

MARUYAMA, Sandra R. *et al.* Non-Leishmania Parasite in Fatal Visceral Leishmaniasis-Like Disease, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 11, p. 2088–2092, 2019.

MATHISON, Blaine A.; BRADLEY, Benjamin T. Review of the Clinical Presentation, Pathology, Diagnosis, and Treatment of Leishmaniasis. **Laboratory Medicine**, v. 54, n. 4, p. 363–371, 1 jul. 2023.

MEVISSSEN, Tycho E. T.; KOMANDER, David. Mechanisms of Deubiquitinase Specificity and Regulation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, n. Volume 86, 2017, p. 159–192, 20 jun. 2017.

MUÑOZ, Christian *et al.* Role of the Ubiquitin-Proteasome Systems in the Biology and Virulence of Protozoan Parasites. **BioMed Research International**, v. 2015, n. 1, p. 141526, 2015.

NANDI, Dipankar *et al.* The ubiquitin-proteasome system. **Journal of Biosciences**, v. 31, n. 1, p. 137–155, 1 mar. 2006.

PATIL, Pratik Rajendra *et al.* Mechanism and evolutionary origins of alanine-tail C-degron recognition by E3 ligases Pirh2 and CRL2-KLHDC10. **Cell Reports**, v. 42, n. 9, 26 set. 2023.

PONTE-SUCRE, Alicia *et al.* Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. e0006052, 14 dez. 2017.

RUSNAC, Domnița-Valeria; ZHENG, Ning. Structural Biology of CRL Ubiquitin Ligases. *In*: SUN, Yi; WEI, Wenyi; JIN, Jianping (Orgs.). **Cullin-RING Ligases and Protein Neddylation: Biology and Therapeutics**. Singapore: Springer, 2020. p. 9–31.

SAMPSON, Chibuzo *et al.* The roles of E3 ubiquitin ligases in cancer progression and targeted therapy. **Clinical and Translational Medicine**, v. 13, n. 3, p. e1204, 2023.

SASIDHARAN, Santanu; SAUDAGAR, Prakash. Leishmaniasis: where are we and where are we heading? **Parasitology Research**, v. 120, n. 5, p. 1541–1554, 1 maio 2021.

SCAZZARI, Mario *et al.* Stalled disomes marked by Hel2-dependent ubiquitin chains undergo Ubp2/Ubp3-mediated deubiquitination upon translational run-off. **Communications Biology**, v. 8, n. 1, p. 132, 28 jan. 2025.

SCHULMAN, Brenda A.; WADE HARPER, J. Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 5, p. 319–331, maio 2009.

SHAO, Sichen *et al.* Structure and Assembly Pathway of the Ribosome Quality Control Complex. **Molecular Cell**, v. 57, n. 3, p. 433–444, 5 fev. 2015.

STEWART, Mikaela D. *et al.* E2 enzymes: more than just middle men. **Cell Research**, v. 26, n. 4, p. 423–440, abr. 2016.

SUN, Yi. Introduction. *In*: SUN, Yi; WEI, Wenyi; JIN, Jianping (Orgs.). **Cullin-RING Ligases and Protein Neddylation: Biology and Therapeutics**. Singapore: Springer, 2020. p. 1–8.

TOMA-FUKAI, Sachiko; SHIMIZU, Toshiyuki. Structural Diversity of Ubiquitin E3 Ligase. **Molecules**, v. 26, n. 21, p. 6682, jan. 2021.

TORRES, Caroline. Caracterização in silico do Complexo E3 Ubiquitina-ligase LinfCrl1 (Cullin 1 RING-ligase) em *Leishmania infantum*. 18 set. 2024.

VAN GRIENSVEN, Johan; DIRO, Ermias. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. **Infectious Disease Clinics of North America, Updates in Tropical Medicine**. v. 33, n. 1, p. 79–99, 1 mar. 2019.

