

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LISANDRO ALFONSO PACHECO LUGO

DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS DE GENÔMICA FUNCIONAL PARA
IMPLEMENTAÇÃO DE ESTRATÉGIAS EM LARGA ESCALA EM *Trypanosoma cruzi*

CURITIBA

2019

LISANDRO ALFONSO PACHECO LUGO

DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS DE GENÔMICA FUNCIONAL PARA
IMPLEMENTAÇÃO DE ESTRATÉGIAS EM LARGA ESCALA EM *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências (Bioquímica) pelo Programa de Pós-graduação em Ciências (Bioquímica) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Wanderson Duarte Darocha

Coorientador: Prof. Dr. Christian Macagnan Probst.

CURITIBA

2019

Ficha catalográfica

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Lugo, Lisandro Alfonso Pacheco
Desenvolvimento de ferramentas de genômica funcional para
implementação de estratégias em larga escala em *Trypanosoma cruzi*. /
Lisandro Alfonso Pacheco Lugo. – Curitiba, 2019.
121 p.: il.

Orientador: Wanderson Duarte Darocha
Coorientador: Christian Macagnan Probst
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

1. *Trypanosoma cruzi* 2. Eletroporação 3. Genômica 4. Chagas,
Doença de 5. Nifurtimox I. Título II. Darocha, Wanderson Duarte III.
Probst, Christian Macagnan IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências -
Bioquímica.

CDD (20. ed.) 591.192



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016/03P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **LISANDRO ALFONSO PACHECO LUGO** intitulada: **DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS DE GENÔMICA FUNCIONAL PARA IMPLEMENTAÇÃO DE ESTRATÉGIAS EM LARGA ESCALA EM *Trypanosoma cruzi***, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 26 de Março de 2019.

WANDERSON DUARTE DA ROCHA

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

MARCELO MÜLLER DOS SANTOS

Avaliador Interno ()

ANA PAULA CABRAL DE ARAUJO LIMA

Avaliador Externo (UFRJ)

STENIO PERDIGÃO FRAGA

Avaliador Externo (ICC)

DEDICATÓRIA

Esta tese é dedicada à minha amada esposa, uma fonte inesgotável de inspiração e alento.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela primeira molécula que deu origem a tudo. No mesmo grau de importância agradeço a meu irmão, que foi pai e mãe, que foi tudo. A vida é de oportunidades, e você me deu uma única chance de avançar. A minha satisfação maior na vida é poder dizer que cumpri com você.

A minha esposa Yirys Diaz Olmos, por ter me acompanhado todos esses anos. Pela amizade, pelo amor, e especialmente pelo Esteban. Vocês com certeza fizeram esse processo de formação muito mais fácil. Esteban, filho, eu quero que você saiba que a decisão de estar aqui esses 4 anos, longe do calor de nosso lar, foi por você. Você entenderá depois o valor dessa decisão. Eu amo vocês!

A minha família, espero poder retribuir o tempo que ficamos longe. Um dos ensinamentos desse processo foi saber quanto vocês são importantes na minha vida.

Ao meu orientador Wanderson por ter me dado a oportunidade de fazer parte da família GFP. Sou infinitamente agradecido por ter sido parte do crescimento do Lab GFP, um lugar que foi meu lar literalmente. Só faltou dormir aí. Muito obrigado pelas conversas científicas que aconteceram, pelo apoio, pela ORIENTAÇÃO, e sobre todo pela amizade. Estou convencido que o nosso relacionamento profissional não acaba aqui.

Aos colegas do Lab GFP. Um agradecimento especial a José Sáenz García e Rodrigo Brant, pelo companheirismo e pela valiosa contribuição na purificação da enzima CRE recombinase, apoio fundamental nos resultados descritos no capítulo III. À aluna de IC Natally Silveira pelo apoio com experimentos de biologia molecular básica. À Normanda Souza Melo, quem fez a minha adaptação ao Lab muito mais fácil, por me ensinar português, e por tanta ajuda técnica em diferentes experimentos. Aos demais membros do grupo: Melissa, Ana María, Laiane, Leticia, Bruno, Izadora, Kelly, Lara, muito obrigado sempre. A todos vocês eterna gratidão.

Ao ICC pela disponibilidade de fazer experimentos lá, que foram muitos. Em especial aos pesquisadores Stenio Fragoso, Fabricio Marchini e Christian Probst por abrir as portas do Instituto para mim. Ao pessoal do lab de células tronco por facilitar o nucleofector. A

Priscila Hiraiwa e Rodrigo Netto pelo apoio técnico com o citometro de fluxo. À Yirys Diaz Olmos por todo o apoio técnico e humano recebido de sua parte. Foram muitos experimentos em que você me apoiou. Sou muito grato por isso!

Novamente agradecer aos Drs Stenio Fragoso e Emanuel Maltempi de Souza pela revisão dos relatórios e pelas sugestões e críticas construtivas ao trabalho.

Ao pessoal do Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio pelo apoio com a disponibilização de equipamentos e infraestrutura em geral.

À pós-graduação em Ciências, Bioquímica, pela oportunidade.

As agências financiadoras CAPES, CNPq, Araucária, pelo apoio financeiro.

À Organização de Estados Americanos (OEA) pela bolsa.

À Universidade Simón Bolívar (Barranquilla, Colômbia) por ter permitido que eu estiver aqui esses 4 anos.

*“There are no secrets to success. It is the result of preparation, **hard work**, and learning from failure”*. Colin Powell

*“There is never just one thing that leads to success for anyone. I feel it always a combination of passion, dedication, **hard work**, and being in the right place at the right time”*. Lauren Conrad

RESUMO

Trypanosoma cruzi é um protozoário com um ciclo de vida complexo, que envolve hospedeiros invertebrados e vertebrados, incluindo o humano, onde o parasito pode causar a doença de Chagas. As formas de tratamento desta doença são incipientes e com efeitos colaterais severos. Apesar de vários genes já terem sido associados a resistência, abordagens globais baseadas em manipulação da expressão gênica foram muito pouco exploradas. Este parasito tem um grande repertório de genes, muitos de função desconhecida, para se adaptar aos mais diferentes ambientes, multiplicar, infectar, e etc. Esta carência de informação pode ser explicada em parte, até poucos anos atrás, pela inexistência de ferramentas para explorar função gênica em larga escala, ou pela escassez dos métodos convencionais de genômica funcional. Esse cenário nos propulsiona a desenvolver/adaptar metodologias de genômica funcional, e otimizar método de transfecção, que permitam contribuir ao entendimento da biologia celular deste organismo. Neste trabalho objetivou-se desenvolver e otimizar ferramentas de genômica funcional. No capítulo I, será descrito a otimização das condições de eletroporação de formas epimastigotas do *T. cruzi*, na forma de artigo publicado intitulado “*Effective gene delivery to Trypanosoma cruzi epimastigotes through nucleofection*”. Neste subprojeto foi possível aumentar as eficiências de transfecção transiente em aproximadamente 3 vezes comparando-se com métodos convencionais de eletroporação, além de proporcionar alta taxa de viabilidade dos parasitos (>90%). No capítulo II descreve-se o desenho e construção de bibliotecas funcionais de *Open Reading Frames* (ORFs) e sua avaliação funcional em um protocolo de seleção de genes que em superexpressão estariam associados a resistência ao benzonidazol. Nessa abordagem preliminar foi possível identificar e validar uma ORF de Dm28c que codifica a proteína RNP-U2 como envolvida direta ou indiretamente no mecanismo de resistência à droga. Uma vez que no capítulo anterior foram geradas bibliotecas de superexpressão constitutiva que apresentam aparentemente baixa representatividade, decidimos no capítulo III desenvolver uma ferramenta baseada em recombinação para controle da expressão de forma eficiente em *T. cruzi* que também poderá ser aplicada para integração de sequências no genoma. Duas abordagens foram testadas, o sistema Cre-DOG e o sistema CREditing, e apresentadas na forma de artigo (submetido). Dos dois sistemas testados apenas CREditing se mostrou bastante eficiente. No sistema CREditing, a CRE recombinase fusionada a NLS de *T. cruzi* é obtida na forma recombinante purificada e é introduzida em formas epimastigotas por eletroporação. Este sistema foi capaz de ativar ou reprimir a expressão de genes repórteres ou de genes associados ao metabolismo do benzonidazol pela inversão de sequência. CREditing também permitiu deletar segmentos genômicos integrados em locos endógenos do parasito e superexpressar genes apenas em formas presentes no hospedeiro mamífero. Em conclusão, mostrou-se que o protocolo de eletroporação otimizado descrito no capítulo I permitiu melhorar a transferência de DNA plasmidial para formas replicativas do parasito, e mostramos que essas melhoras permitiram a transferência eficiente de bibliotecas de *Open Reading Frames* em formas epimastigotas de *T. cruzi*, levando à identificação de algumas ORFs associadas à resistência ao benzonidazol, como foi mostrado no Capítulo II. Esses protocolos permitirão em um futuro desenvolver estudos de genômica funcional em larga escala em *T. cruzi*, um protozoário difícil de manipular por técnicas convencionais.

Palavras chave: *Trypanosoma cruzi*, eletroporação, genômica funcional, benzonidazol, CRE recombinase.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is a protozoan with complex lifecycle, involving vertebrate and invertebrate hosts, including humans, causing Chagas disease. The drug treatment of this disease is incipient and with severe side effects. Although several genes have been associated with drug resistance, global approaches based on manipulation of gene expression are poorly explored. This parasite has a large repertoire of genes, many of them with unknown function, to adapt to different environments, multiply, infect, and so on. This lack of information can be partially explained by the lack of tools to exploit gene function on a large scale, or by the scarcity of conventional methods of functional genomics, until few years ago. This scenario prompts us to develop/adapt methodologies to do functional genomics, and to optimize transfection method, allowing to understand the cellular biology of this organism. In Chapter I, the optimization of the electroporation conditions of *T. cruzi* epimastigotes forms that will be presented as a published paper entitled "Effective gene delivery to *Trypanosoma cruzi* epimastigotes through nucleofection". At this point, it was possible to increase 3x transient electroporation efficiency compared to conventional electroporation methods, in addition to providing high parasite viability (> 90%). In Chapter II we describe the design and construction of functional library of *T. cruzi* Dm28c Open Reading Frames (ORFs) and its functional evaluation using a protocol to identify genes whose overexpression would be associated with benznidazole resistance. In this preliminary approach, it was possible to identify and validate a Dm28c ORF that encodes the RNP-U2 protein as directly or indirectly involved in drug resistance mechanism. Due to the apparent low representativeness of ORFs from the constitutive overexpression library, we decided to develop a recombination-based tool for efficient gene expression control in *T. cruzi* that could also be applied for genome sequence integration (Chapter III). Two approaches were tested, the Cre-DOG system and the CREditing system, and the data were presented in the form of a submitted manuscript. Only CREditing presented reliable results presenting very good recombination efficiency. In the CREditing system, CRE recombinase fused to a *T. cruzi* H2B nuclear localizing signal (NLS) was obtained in the purified recombinant form and it was introduced into epimastigote forms by electroporation. This system was able to activate or repress the expression of reporter genes or genes associated with benznidazole metabolism. CREditing also allowed to delete genomic segments integrated into the endogenous locus of the parasite, and also to overexpress genes in tissue culture derived trypomastigotes. In conclusion, it was shown that the optimized electroporation protocol described in chapter I allowed to improve the transfer of plasmid DNA to replicative forms of the parasite. Using the optimized electroporation protocol, functional genomics library for ORF overexpression were introduced into *T. cruzi* epimastigotes forms, leading to the identification of an ORF associated with resistance to benznidazole (Chapter II). These protocols in combination with the recombination tool described in Chapter III will allow in a near future to develop large-scale functional genomics in *T. cruzi*, a protozoan difficult to manipulate by conventional techniques.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, electroporation, functional genomics, benznidazole, CRE recombinase.

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Ciclo de vida do Trypanosoma cruzi.....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 2. Transcrição e processamento de RNAs mensageiros em tripanossomatídeos. ..</i>	<i>21</i>
<i>Figura 3. RNAi target sequencing (RIT-Seq).....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 4. Mecanismo de ação do Bz e NFX.</i>	<i>27</i>

CAPITULO I. EFFECTIVE GENE DELIVERY TO *Trypanosoma cruzi* EPIMASTIGOTES THROUGH NUCLEOFECTIOIN. Artigo publicado.

<i>Figura 5. Transient transfection efficiency in epimastigote forms from Trypanosoma cruzi using different electroporation conditions.</i>	<i>42</i>
<i>Figura 6. Epimastigote permeabilization by different electroporation protocols using FITC-Dextran.....</i>	<i>43</i>

CAPITULO II. DESENHO E CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS DE SUPEREXPRESSÃO DE ORFs PARA IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS GENES RELACIONADOS A RESISTÊNCIA A DROGAS EM *T. cruzi*.

<i>Figura 7. Esquema geral da estratégia de clonagem Gateway®.</i>	<i>51</i>
<i>Figura 8. Estratégia geral de clonagem da biblioteca de ORFs no vetor pTREX-GW-Neo.</i>	<i>52</i>

<i>Figura 9. Avaliação da frequência de integração do vetor pTREX.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 10. Confirmação do tamanho dos fragmentos clonados em cada pool de plasmídeos.</i>	<i>55</i>
<i>Figura 11. Genotipagem por PCR para estimar abundancia de clones nas populações carregando o ORFoma.</i>	<i>56</i>
<i>Figura 12. Clonagem de parasitas individuais por diluição limitante..</i>	<i>57</i>
<i>Figura 13. Esquema geral do protocolo de seleção de parasitos com resistência induzida a BZ nas (P.C.1. e P.C.2: Pop.Combs. 1 e 2).....</i>	<i>59</i>
<i>Figura 14. Genotipagem das populações submetidas ao protocolo de seleção com benzonidazol.....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 15. A RNP-U2 está associada a resistência a benzonidazol.....</i>	<i>61</i>

CAPITULO III. CREditing: A powerful tool for gene tuning in *Trypanosoma cruzi*. Manuscrito submetido.

<i>Figure 16. CRE-DOG approach.....</i>	<i>80</i>
<i>Figura 17. CRE-DOG approach is not functional in T. cruzi.....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 18. Expression and purification of CRE recombinase.....</i>	<i>82</i>
<i>Figura 19. In vivo recombination with TcNls-Cre.....</i>	<i>84</i>
<i>Figura 20. Cre-mediated recombination show high efficiency to turn-off the expression of GFP.....</i>	<i>86</i>
<i>Figura 21. TcNls-Cre is functional in an endogenous locus.....</i>	<i>87</i>
<i>Figura 22. Conditional NTR and AKR overexpression using CREditing... ..</i>	<i>88</i>
<i>Figura 23. TCT forms of T. cruzi were efficiently transfected with Cre recombinase.....</i>	<i>89</i>

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I. *EFFECTIVE GENE DELIVERY TO Trypanosoma cruzi* *EPIMASTIGOTES THROUGH NUCLEOFECTION*. Artigo publicado.

Tabela 1. Effects of buffer composition on transient transfection efficiency. 45

CAPITULO II. *DESENHO E CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS DE* *SUPEREXPRESSÃO DE ORFs PARA IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS GENES* *RELACIONADOS A RESISTÊNCIA A DROGAS EM T. cruzi*.

Tabela 2. Genes associados a resistência a benzonidazol em populações de T. cruzi com
resistência natural ou induzida. 59

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 DOENÇA DE CHAGAS	17
2.2 FORMAS DE TRANSMISSÃO DA DOENÇA DE CHAGAS	17
2.3 CICLO DE VIDA DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
2.4 GENOMA DO <i>Trypanosoma cruzi</i> E REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA 18	
2.5 COMO EXPLORAR FUNÇÃO GÊNICA EM <i>T. cruzi</i> ?.....	20
2.5.1 ABORDAGENS DE GANHO DE FUNÇÃO	20
2.5.2 ABORDAGENS DE PERDA DE FUNÇÃO.....	24
2.6 MECANISMO DE AÇÃO DAS DROGAS ANTI-TRIPANOSOMAIIS BENZONIDAZOL E NIFURTIMOX.....	26
2.7 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM CEPAS DE <i>T. cruzi</i> COM RESISTÊNCIA NATURAL OU INDUZIDA A BENZONIDAZOL.....	28
2.8 O PAPEL DAS NITROREDUCTASES NO MECANISMO DE RESISTÊNCIA A BZ E NFX: A SUPEREXPRESSÃO PODE GERAR SUSCEPTIBILIDADE	29
3 JUSTIFICATIVA.....	32
4 OBJETIVOS.....	34
4.1 OBJETIVO GERAL:.....	34
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:	34
5 RESULTADOS.....	35
ABSTRACT	37
BACKGROUND	37
RESULTS.....	38
ACKNOWLEDGMENTS	41
REFERENCES	44
RESUMO	48
INTRODUÇÃO.....	49
RESULTADOS	51
DISCUSSÃO.....	62
MATERIAIS E MÉTODOS.....	66

ABSTRACT	76
INTRODUCTION	77
RESULTS	79
DISCUSSION.....	90
CONCLUSION	93
SUPPLEMENTARY MATERIAL.....	94
MATERIAL AND METHODS.....	95
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	104
REFERÊNCIAS	107

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, e é considerada endêmica na América Latina. Estima-se que a doença de Chagas ocasiona anualmente 10.000 mortes, e apesar do número de pessoas em risco de contrair a doença ter diminuído nos últimos anos, ainda existem 7 milhões de pessoas que moram em áreas de alto risco epidemiológico. Atualmente não existe vacina aprovada para a doença de Chagas, e unicamente duas drogas foram aprovadas para o tratamento da infecção: Nifurtimox e Benzonidazol. Essas drogas têm sido usadas por mais de 40 anos como a única alternativa de tratamento, apesar dos fortes efeitos colaterais adversos e a contínua aparição de cepas naturalmente resistentes a esses derivados nitroheterocíclicos. Assim, a busca de novas drogas com potencial tripanocidas é uma prioridade mundial, toda vez que a doença deixou de ser exclusiva da América Latina para se converter em um sério problema de saúde pública mundial, devido principalmente aos altos fluxos migratórios desde a América do sul a Europa e América do norte, associados a fenômenos sociais cada vez mais frequentes nessa área do continente americano.

T. cruzi é um parasito complexo, com um ciclo de vida que envolve hospedeiros vertebrados e invertebrados. No ano 2005 um consórcio internacional publicou os dados do sequenciamento dos 3 tripanossomatídeos com alta relevância desde o ponto de vista epidemiológico: *Trypanosoma brucei*, *Leishmania major* e *T. cruzi*. Esses dados genômicos revelaram detalhes importantes sobre vários aspectos relacionados com: ciclo de vida, virulência, preferência por determinados hospedeiros, entre outros. Desde então, grandes avanços têm sido alcançados ao nível de genômica funcional, principalmente em *T. brucei* e *Leishmania* spp. No entanto, ainda existe um grande *lag* quanto aos avanços em *T. cruzi*. Isso é explicado basicamente às poucas ferramentas disponíveis para manipular esse protozoário, em que a maioria de abordagens funcionais que são utilizados de forma rotineira em eucariotos convencionais, incluindo o membro relacionado *T. brucei*, não funcionam de forma eficiente em *T. cruzi*. Por exemplo, a interferência por RNA que tem mostrado um grande potencial para explorar função gênica em *T. brucei*, não funciona em *T. cruzi*. Um reflexo disso é a alta porcentagem de genes que ainda estão anotados como hipotéticos na base de dados TriTryp (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>).

A superexpressão constitutiva de genes é outra abordagem que tem permitido descobrir a função de muitos genes em diferentes organismos modelos, principalmente quando é usado em escala genômica. Apesar de existirem vetores plasmidiais para a expressão otimizada em *T. cruzi*, com sequências reguladoras que garantem elevados níveis de expressão constitutiva, esses vetores têm sido usados de forma rotineira para avaliar a expressão de genes individuais e não como uma ferramenta de superexpressão em larga escala. A principal limitação para o uso desse tipo de abordagens na escala genômica está relacionada com a baixa eficiência de transferência de DNA plasmidial para formas replicativas e infecciosas do parasito.

Esse cenário obriga a continuar na procura de novas metodologias e otimizar as já existentes para contribuir com o desenvolvimento de ferramentas moleculares funcionais que permitam explorar a função de genes do *T. cruzi* que ainda são considerados hipotéticos. Nesse trabalho, objetivou-se desenvolver abordagens genômicas funcionais em *T. cruzi*, com foco principal em: 1) condições de transfecção, 2) estratégia de superexpressão em larga escala, e 3) aprimoramento do sistema CRE-*lox* para ser aplicado nas diferentes formas do parasito. Esperamos que os nossos resultados permitam o crescimento da genômica funcional em larga escala em *T. cruzi*., e que as metodologias desenvolvidas aqui sejam aplicadas a organismos relacionados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana é resultado da infecção pelo parasito *Trypanosoma cruzi*, afetando de 6 a 7 milhões de pessoas mundialmente, causando 7000 mortes por ano. Apesar de décadas de esforços para controlar a doença, o que tem repercutido positivamente na redução da incidência de casos, milhões de pessoas estão infectadas cronicamente nas etapas mais produtivas de suas vidas, o que leva a perpetuação do ciclo da pobreza em algumas regiões endêmicas (SOSA-ESTANI; COLANTONIO; SEGURA, 2012). A doença é endêmica em América Latina, onde é transmitida a humanos por insetos da família *Triatominae* que são encontrados unicamente nas Américas. No entanto, a doença de Chagas tem se convertido em um problema de saúde pública global devido ao aumento na migração de latino-americanos a países não endêmicos, particularmente a América do Norte e Europa (COURA, José Rodrigues; VIÑAS, 2010).

2.2 FORMAS DE TRANSMISSÃO DA DOENÇA DE CHAGAS

Apesar da principal forma de transmissão do parasito envolver o vetor invertebrado, a infecção pode acontecer por várias outras vias. Indivíduos podem se infectar através de transmissão congênita, transfusões sanguíneas, transplante de órgãos, acidentes de laboratório, consumo de alimentos contaminados com fezes de insetos infectados e sexualmente (Centers for Disease Control and Prevention [CDC] 2018). Surtos de transmissão oral da doença de Chagas foram descritos no Brasil, Venezuela, Colômbia, Guayana Francesa, Bolívia, Argentina e Equador (BENCHIMOL BARBOSA, 2006;COURA, J. R. et al., 1997;DIAS et al., 2008;SÁNCHEZ; RAMÍREZ, 2013;SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012;TOSO M; VIAL U; GALANTI, 2011). Todos esses surtos foram associados com consumo de alimentos/bebidas contaminados e também carne de animais selvagens, vegetais, suco de cana de açúcar, polpa de açaí, e vinho de palma, entre outros (BARBOSA-FERREIRA et al., 2010;FERREIRA et al., 2001;PEREIRA et al., 2009). Entre os anos 1968 e 2000, 50% dos casos agudos da doença

de Chagas na região amazônica foram atribuídos à transmissão oral, e esse número alcançou 70% entre 2000 e 2010 (SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012). A taxa de mortalidade em pacientes infetados oralmente é estimada em 8-35%, valores significativamente mais elevados que a transmissão vetorial clássica, por meio da excreta do vetor triatomíneo (<5–10%) (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

2.3 CICLO DE VIDA DO *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi apresenta diferentes fases durante seu ciclo de vida (Revisado em (CLAYTON, 2010). No inseto vetor da família *Reduviidae*, o parasito replica em uma forma chamada de epimastigota, que sob condições de estresse sofre um processo de diferenciação celular para se transformar em tripomastigotas metacíclicos (TM), uma forma infecciosa não replicativa. Esses TMs podem entrar em um hospedeiro mamífero por meio das fezes contaminadas de um triatomíneo infectado no momento da ingesta sanguínea, onde eles invadem um variado número de células. No interior da célula os TMs transformam em amastigotas, e replicam intracelularmente. Os amastigotas diferenciam em tripomastigotas altamente móveis que emergem da célula infetada, liberando as formas sanguíneas infecciosas que podem invadir novas células ou serem ingeridos durante uma nova ingesta sanguínea de outro triatomíneo, completando o ciclo infeccioso do *T. cruzi* (Figura 1).

2.4 GENOMA DO *Trypanosoma cruzi* E REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

A tentativa de sequenciamento e montagem completa do genoma diploide do clone CL Brener, estimado em 110 megabases, foi publicado em 2005 (EL-SAYED, 2005). Devido à natureza híbrida do genoma deste clone, com um conteúdo repetitivo de 50%, a sequência genômica dessa cepa não foi completamente montada. Regiões homólogas que dispõem altos níveis de polimorfismos foram montados separadamente, resultando em *contigs* correspondentes a cada haplótipo (ver www.TriTrypDB.org). Esse projeto de sequenciamento foi bastante valioso, uma vez que possibilitou a identificação de novas famílias multigênicas espécie-específicas e pela primeira vez deu uma visão global da

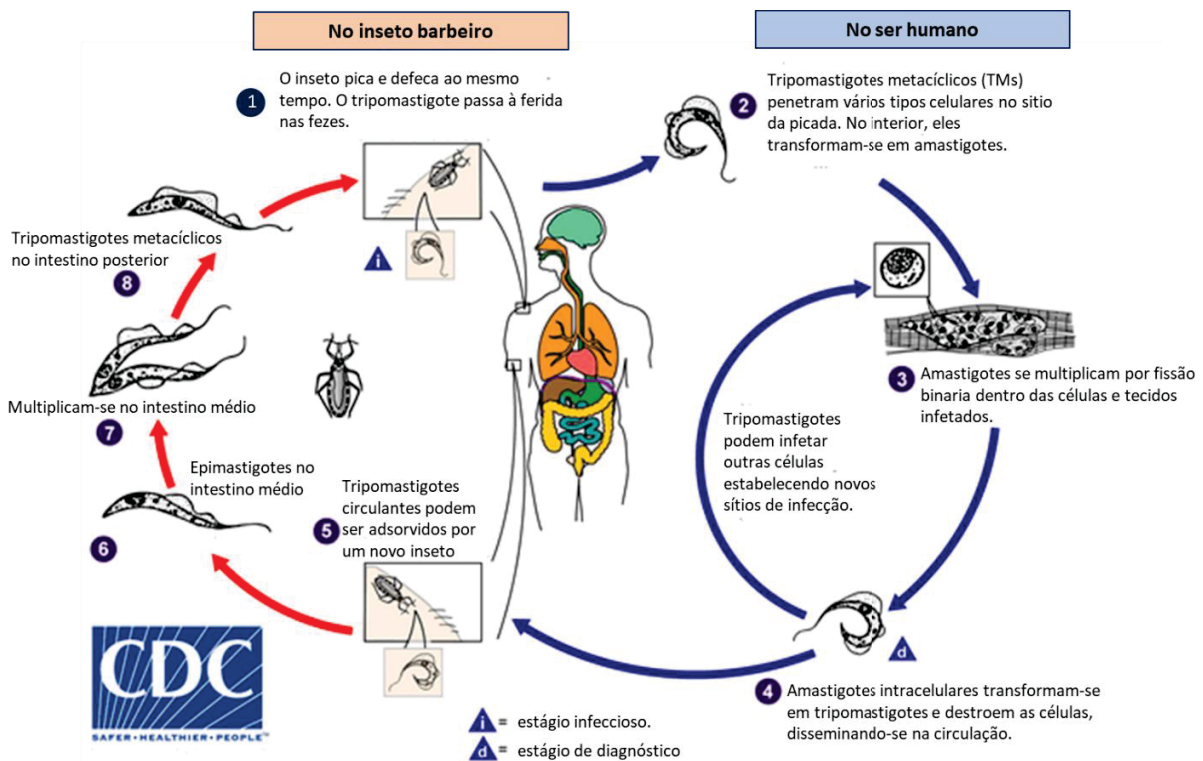


Figura 1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. A principal via de transmissão do parasita é por meio das fezes contaminadas do vetor barbeiro. No sítio da picada os tripomastigotas rapidamente invadem um variado número de células, estabelecendo a infecção primária. Dentro das células os tripomastigotas sofrem um processo de diferenciação em amastigotas, formas não flageladas e replicativas. Na fase final da infecção, os amastigotas diferenciam em tripomastigotas que acabam rompendo as células e se disseminando por diferentes tecidos. Alguns tripomastigotas na circulação podem ser adsorvidos durante uma ingestão sanguínea por parte de outro inseto, onde o parasita sofre vários processos de diferenciação. **Fonte: CDC, 2015.**

arquitetura genômica do *T. cruzi*. Esse sequenciamento também tornou possível identificar sequências conservadas nos tripanossomatídeos (EL-SAYED, 2005).

Esta montagem foi melhorada posteriormente por (WEATHERLY; BOEHLKE; TARLETON, 2009). Novos sequenciamentos genômicos de cepas/clones de *T. cruzi* têm sido publicados desde então (FRANZÉN et al., 2011; 2012; GRISARD et al., 2014), usando novas tecnologias de sequenciamento, tais como Roche 454, Illumina, e mais recentemente PacBio (BERNÁ et al., 2018), resultando em montagens de melhor qualidade.

Os genes que codificam proteínas em *T. cruzi* estão organizados em longas unidades de transcrição policistrônicas. A transcrição é iniciada de forma bidirecional entre dois cluster gênicos divergentes para produzir pré-RNAs mensageiros que são subsequentemente processados (MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2003, p.;2004). Com a única exceção do promotor do gene do *splice leader* (SL), nenhum outro promotor que seja reconhecido pela RNA Polimerase II tem sido identificado, e poucos fatores de transcrição têm sido descritos (CRIBB et al., 2004;CRIBB; SERRA, 2009). Uma vez que o pre-RNA policistrônico é produzido, as seguintes duas reações acopladas permitem a geração de transcritos monocistrônicos maduros: *trans-splicing* e poliadenilação (MICHAELI, 2011;TEIXEIRA et al., 2012) (Figura 2). Na reação de *trans-splicing* é adicionada uma sequência de 39 nucleotídeos do gene do mini exón conhecido como *splice-leader* (SL), no 5'-UTR de cada RNA mensageiro, e essa reação depende da reação de poliadenilação que acontece no 3'-UTR do gene a montante (MICHAELI, 2011;TEIXEIRA et al., 2012). As duas reações requerem motivos ricos em poli-pirimidina localizados dentro das regiões intergênicas. Alinhamentos de diferentes cDNAs com sequências genômicas tem mostrado que, para a maioria dos genes do *T. cruzi*, o sitio de adição do SL consiste de um di-nucleotídeo AG localizado aproximadamente 18 nucleotídeos a jusante do motivo de poli-pirimidina, em tanto que os sítios de poliadenilação usualmente encontram-se localizados 40 nucleotídeos a montante do motivo de poli-pirimidina (BURLE-CALDAS, G. de A. et al., 2015, p.;CAMPOS, P. C. et al., 2008).

2.5 COMO EXPLORAR FUNÇÃO GÊNICA EM *T. cruzi*?

2.5.1 ABORDAGENS DE GANHO DE FUNÇÃO

2.5.1.1 UMA BREVE HISTÓRIA DOS SISTEMAS DE EXPRESSÃO EM *T. cruzi*

Análises genéticas de ganho de função (AGF) são poderosos métodos para identificar genes que conferem um fenótipo celular particular (STARK, 1999). Na forma mais simples,

as AGF consistem na superexpressão gênica regulada usando técnicas de transfecção de DNA ou por transdução viral.

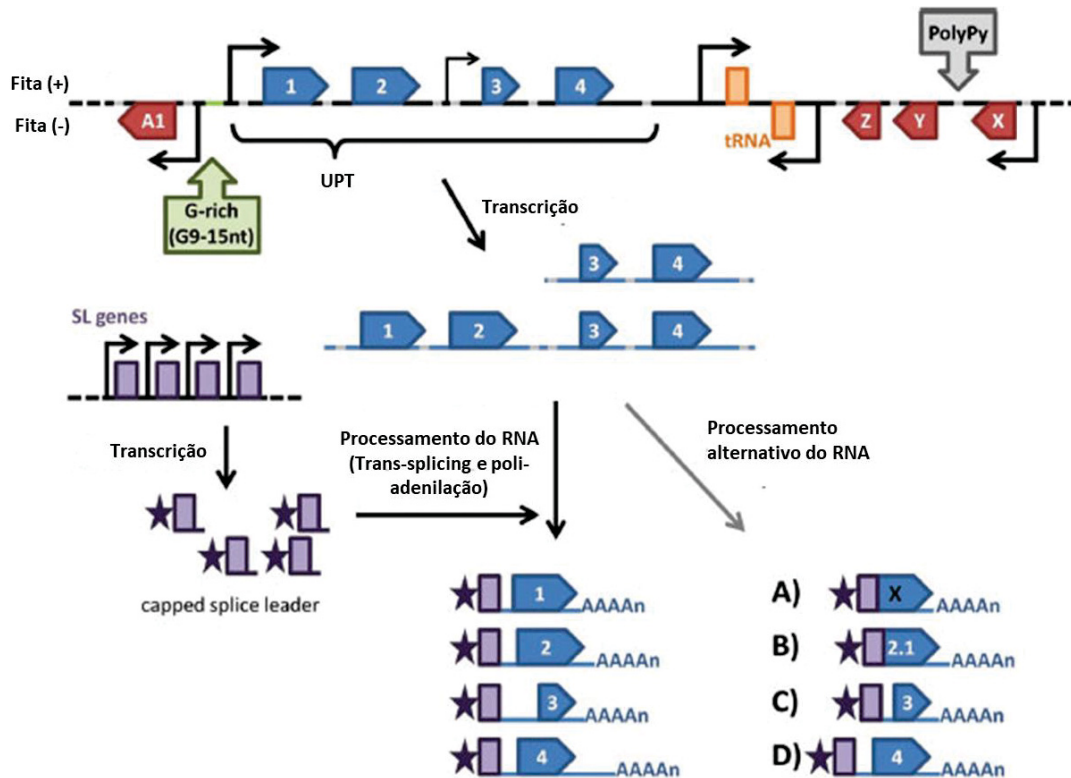


Figura 2. Transcrição e processamento de RNAs mensageiros em tripanossomatídeos. Grandes *clusters* de genes não relacionados (caixas flechas) estão organizados como unidades de transcrição policistônicas (UTP), que estão separadas por regiões de mudança de fita convergentes ou divergentes. Os sítios de início da transcrição pela RNA Pol II (TSS) estão localizados a jusante do primeiro gene da UTP (MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2004, *p.*) ou podem estar como TSS internos (KOLEV *et al.*, 2010). Os RNAs policistônicos (pre-RNAs mensageiros) são individualizados em RNAs mensageiros monocistônicos depois da adição de uma sequência de RNA 39 nucleotídeos (*capped splice leader*) por meio de uma reação de *trans-splicing* e poliadenilação. Pre-RNAs mensageiros policistônicos podem sofrer processamento de RNA alternativo. Adaptado de Teixeira *et al.* (TEIXEIRA *et al.*, 2012). UPT: Unidade policistônica.

A partir dos anos 1990s, vários grupos têm tentado manipular geneticamente o *T. cruzi*. Um dos primeiros reportes de transfecção estável nesse parasito foi conseguido pela eletroporação de epimastigotas com o vetor de expressão pTEX. Esse plasmídeo episomal foi construído usando sequências intergênicas derivadas do gene glicosomal GAPDH

(*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) (KELLY et al., 1992). O vetor pTEX foi melhorado uns poucos anos depois pela inserção de um fragmento de DNA de 800 pares de bases a jusante do sitio de clonagem múltiplo. O resultado, o plasmídeo integrativo pRIBOTEX, tinha um tempo de seleção mais curto e um incremento moderado nos níveis de expressão (MARTÍNEZ-CALVILLO; LÓPEZ; HERNÁNDEZ, 1997). O pRIBOTEX foi posteriormente potenciado pela inserção da região a jusante do gene ribossômico TcP2beta H1 (HX1) logo depois do promotor ribossômico putativo, gerando o vetor pTREX (VAZQUEZ; LEVIN, 1999). Todos esses vetores descritos acima promovem a expressão constitutiva do gene clonado, o que levou ao desenvolvimento de sistemas para a expressão gênica de uma forma controlada e reprimível. Um desses vetores é o pTcINDEX, um vetor de expressão regulado por tetraciclina que integra em uma região espaçadora não transcrita, e tem um promotor T7 a jusante do sitio de início da transcrição pela RNA polimerase I. O pTcINDEX é usado junto com o plasmídeo pLEW13, que constitutivamente expressa a T7 RNA polimerase e os genes repressores (*tetR*) (TAYLOR; KELLY, 2006) DaRocha et al 2004.

O vetor pTREX continua sendo uma ferramenta importante para superexpressão de genes em formas replicativa do *T. cruzi*, com altos níveis de expressão homogênea em diferentes cepas do parasito.

2.5.1.2 DA SUPEREXPRESSÃO INDIVIDUAL A ABORDAGENS EM LARGA ESCALA GENÔMICA

Quando o objetivo é a análise funcional de um limitado número de genes, as abordagens convencionais de superexpressão usando alguns dos vetores acima descrito é a escolha frequente. No entanto, novas ferramentas de superexpressão tem surgido nos últimos anos que possibilitaram o desenvolvimento de sistemas e expressão em larga escala, principalmente associadas a bibliotecas de superexpressão (BSEs). Diferentes estratégias para desenhar e construir BSEs têm sido reportadas, sendo as bibliotecas de cosmídeos e plasmídeos as melhores caracterizadas em tripanossomatídeos. Essas abordagens mostraram ser poderosas ferramentas para identificar genes associados a diversos fenótipos. Cotrim et al. (COTRIM; GARRITY; BEVERLEY, 1999) desenvolveram um método para a

identificação de loci de resistência a drogas no tripanossomatídeo *Leishmania major*. Tomando vantagem que vetores cosmídios podem ser mantidos como episomas em *Leishmania spp.*, os autores transfectaram bibliotecas genômicas inseridas em cosmídeo episomal multicópia em parasitos susceptíveis, e as seleções com droga nessas bibliotecas de transfectantes renderam parasitos com resistência adquirida por cosmídios. Essa abordagem permitiu a identificação de genes relacionados a metabolismo de drogas, incluindo sínteses de esteróis. Semelhante ao que acontece em fungos, *Leishmania* sintetiza ergosterol em lugar de colesterol como o principal esterol de membrana (GOAD; HOLZ; BEACH, 1984), o que oferece um grande potencial para quimioterapia seletiva (COTRIM; GARRITY; BEVERLEY, 1999). Essa estratégia foi usada para isolar transportadores de nucleosídeos (CARTER et al., 2000; VASUDEVAN; ULLMAN; LANDFEAR, 2001), um translocador de miltefosine (PEREZ-VICTORIA et al., 2003), e um gene de susceptibilidade a antimônio (MARQUIS et al., 2005).

Os tripanossomas africanos não formam episomas de forma espontânea em resposta a seleção com droga, e a amplificação gênica não é usual. Assim, métodos alternativos para fenotipagem em larga escala têm sido desenvolvidos. Begolo et al (BEGOLO; ERBEN; CLAYTON, 2014) construíram uma BSE induzível por tetraciclina contendo fragmentos de DNA genômicos aleatórios. Essa biblioteca foi transfectada na forma sanguínea do *Trypanosoma brucei*, e a biblioteca de parasitos transformados foi obtida. Como prova de conceito, eles selecionaram essa população com as drogas DFMO e DDD85646. DFMO é usado na prática clínica para o tratamento da doença do sono, e o alvo dela é a ornitina descarboxilase (ODC). DDD85646 é um inibidor da N-miristoiltransferase (NMT), uma proteína essencial envolvida em miristoilação (PRICE et al., 2010). Depois da indução da BSE com tetraciclina e seleção, a biblioteca foi amplificada por PCR e os insertos obtidos foram sequenciados. Ao comparar com a biblioteca original (não induzida) mostrou que os genes superexpressos estavam oferecendo uma vantagem de crescimento. Os únicos genes funcionais recuperados em cada caso foram ODC e NMT, demonstrando o potencial dessas abordagens para identificar e confirmar alvos de drogas.

No *T. cruzi*, as baixíssimas eficiências de transfecção transiente pelos métodos convencionais e sistemas induzíveis pouco eficientes têm limitado o uso das BSE para

abordagens funcionais em larga escala. Recentemente o nosso grupo (PACHECO-LUGO et al., 2017) e outros grupos (OLMO et al., 2018) conseguiram melhorar o cenário da transferência de DNA em formas replicativas do parasito, o que permitirá em um futuro poder implementar esse tipo de metodologias para o descobrimento de novos alvos de drogas.

2.5.2 ABORDAGENS DE PERDA DE FUNÇÃO

As análises de perda de função (APF) têm sido reportadas usando uma variedade de métodos, desde RNA de interferência (RNAi) a CRISPR-Cas9. RNAi revolucionou a área da genômica funcional possibilitando as análises genômicas em larga escala de perda de função em células em cultivo. Essas abordagens são extremamente poderosas para a identificação sem viés de genes envolvidos em uma ampla faixa de processos, e podem ser usados, por exemplo, para identificar proteínas envolvidas em metabolismo e internalização de drogas (ITO et al., 2005).

RNAi facilita a avaliação da função gênica silenciando a expressão de um gene usando oligonucleotídeos antisense ou plasmídeos (HANNON, 2002). O método aproveita um mecanismo fisiológico que reprime a expressão gênica, primariamente causando a degradação dos transcritos do RNA mensageiro. O silenciamento em larga escala usando abordagens de alto processamento com RNAi tem sido bem-sucedido quando aplicados em *T. brucei*, onde a maquinaria de RNAi é funcional. Alsford e cols. (ALSFORD et al., 2011) desenharam bibliotecas de RNAi induzíveis por tetraciclina em *T. brucei* para identificar os genes que contribuem a ação de drogas. Nessas abordagens, parasitas em replicação só persistem em um ambiente tóxico se o silenciamento confere uma vantagem seletiva. Após induzir a biblioteca de RNAi e fazer pressão seletiva com diferentes drogas usadas para o tratamento da doença do sono, foram encontrados alguns transportadores, vias metabólicas e enzimas envolvidas em ação de drogas anti-tripanosomais, confirmando o potencial dessa estratégia. A abordagem toma vantagem do sequenciamento direcionado de RNAi (*RIT-seq*). Na abordagem RIT-seq é gerada uma biblioteca para silenciamento de todos os genes via RNAi. Brevemente, fragmentos aleatórios (600 pb) são introduzidos por clonagem em um vetor que permite a indução da expressão deste fragmento na forma de RNA dupla fita

(dsRNA), que disparará o mecanismo de silenciamento da expressão gênica sequência específica. Uma vez gerada essa biblioteca em *E. coli*, esta é introduzida em *T. brucei* gerando populações recombinantes, onde a importância do gene silenciado é identificada pela alteração na representatividade do clone na população na condição de interesse (p.ex. diferenciação) após a indução do silenciamento por RNAi, tendo a condição não induzida como referência.

Nos trabalhos previamente citados, a representatividade dos clones foi determinada por sequenciamento em larga escala utilizando a plataforma Illumina, utilizando-se sequências do vetor adjacente ao fragmento clonado para direcionamento da região a ser sequenciada (Figura 3). Em *T. brucei*, essas abordagens em larga escala foram otimizadas usando um sistema baseado em meganucleases que melhoram a eficiência de integração melhorando a representatividade da biblioteca (GLOVER; HORN, 2009).

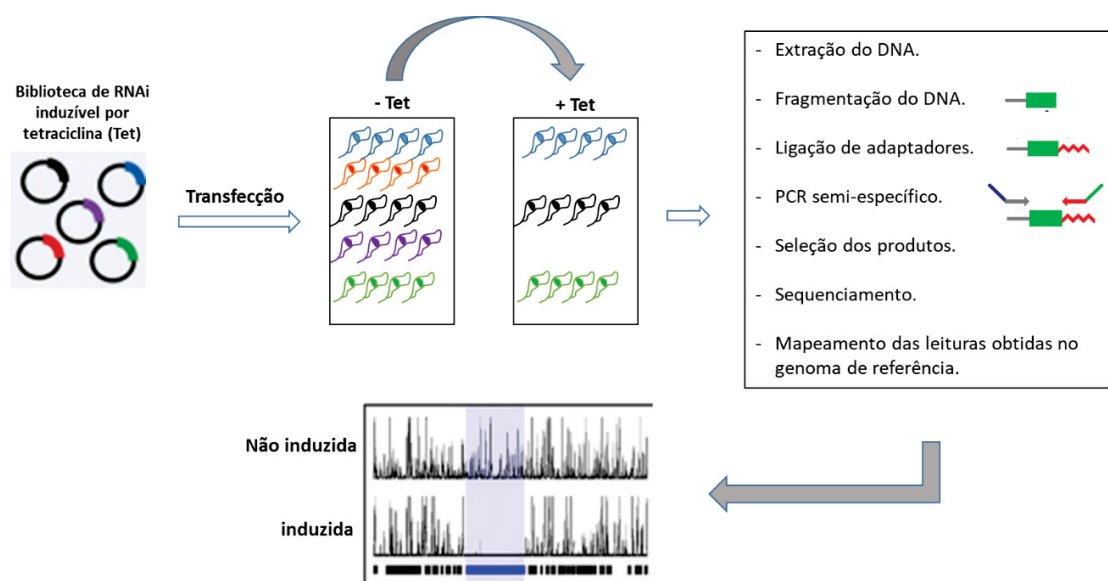


Figura 3. RNAi target sequencing (RIT-Seq). RIT-Seq é uma abordagem que fornece uma leitura de alta resolução em escala genômica após silenciamento por RNAi. Uma biblioteca de RNAi, induzível por tetraciclina (Tet), é transfectada em formas replicativas do *Trypanosoma brucei*. Após a indução da biblioteca com Tet sob uma condição teste (na presença de uma droga tripanocida, por exemplo), aqueles parasitas que tem uma vantagem de crescimento pelo silenciamento de um gene associado com o transportador da droga (por exemplo) vão sobreviver. Para identificar os genes associados a sobrevivência dessas populações, sequenciamento em larga escala é executado, com primers flanqueando o sitio de clonagem dos RNAi, o que possibilita um sequenciamento direcionado (*target sequencing*). Por fim, análises bioinformáticas revelam um número reduzido de leituras em aqueles genes associados ao metabolismo da droga.

Porém, apesar da versatilidade da abordagem em larga escala usando RNAi para responder perguntas biológicas, nem *T. cruzi* (DAROCHA; OTSU et al., 2004), nem *Leishmania major* ou *L. donovani* (ROBINSON; BEVERLEY, 2003) foram capazes de responder a RNA de cadeia dupla, indicativo de que esses tripanosomas carecem de uma via de RNAi funcional, basicamente pela ausência de genes associados a esse sistema (EL-SAYED, 2005; IVENS, 2005). Outras abordagens, especificamente o sistema de edição genômica CRISPR-Cas9, tem sido usado de forma bem-sucedida nos últimos anos como uma ferramenta fundamental para nocautear genes em *T. cruzi* e em *Leishmania* spp. No caso particular do *T. cruzi*, diversas estratégias tem sido utilizadas para editar usando o sistema CRISPR-Cas9, começando pelas abordagens convencionais de superexpressão da nuclease Cas9 usando vetores otimizados (LANDER et al., 2015a; PENG et al., 2015a; ROMAGNOLI et al., 2018). Mais recentemente pela transfecção direta de complexos ribonucleoprotéicos formados *in vitro* pela nuclease SaCas9 e RNAs guias particulares (BURLE-CALDAS, G. A. et al., 2018; SOARES MEDEIROS et al., 2017). Esses avanços em conjunto com as novas estratégias de expressão *in vivo* do RNA guia (sgRNA) por meio da superexpressão ectópica da enzima T7 RNA polimerase (COSTA et al., 2018) mostram o potencial da metodologia para interrogar função gênica em *T. cruzi*, a pesar que ainda falta por explorar a funcionalidade do mecanismo de edição genômica CRISPR-Cas9 em larga escala.

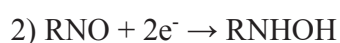
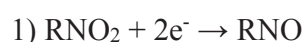
2.6 MECANISMO DE AÇÃO DAS DROGAS ANTI-TRIPANOSOMAS BENZONIDAZOL E NIFURTIMOX

Não existe vacina para a prevenção da doença de Chagas devido a sua complexa patologia (WILKINSON; KELLY, 2009). A única forma de combater a doença é o tratamento quimioterápico baseado em dois compostos nitroheterocíclicos desenvolvidos há mais de 40 anos: Benzonidazol (BZ) e Nifurtimox (NFX) (COURA, José Rodrigues; CASTRO, 2002; URBINA, 2010; VIOTTI et al., 2009). Em geral, BZ é a primeira opção de tratamento na maioria dos países principalmente pela melhor tolerabilidade (ROJO et al., 2014). Porém, nenhuma dessas drogas é segura devido aos seus efeitos colaterais tóxicos, requerem programas terapêuticos de longo termo e apresentam eficácia inconsistente. Ensaios clínicos reportam que o tratamento baseado nesses dois compostos (seja em forma simultânea ou

separadamente) conseguem porcentagens de cura superior a 80% na fase aguda da doença (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2000). Porém, na fase crônica, as porcentagens de cura são entre 5 e 20% (CANCADO, 2002). Além disso, NFX e BZ ambas são pró-drogas ativadas pela mesma nitroreductase mitocondrial (MEJIA et al., 2012; WILKINSON et al., 2008), que ocasionalmente leva a resistência cruzada. Finalmente, a eficácia do tratamento poderia variar de acordo com a área geográfica como consequência de diferenças na susceptibilidade às drogas por diferentes cepas de *T. cruzi* (BERMUDEZ et al., 2016). Apesar de compartilharem muitas características estruturais, NFX e BZ possuem mecanismos de ação diferentes.

BZ atua através da formação de radicais livres e metabólitos eletrofilicos que são gerados quando o grupo nitro é reduzido a um grupo amino pela ação de nitroreductases do parasito (MAYA et al., 2007). Esses metabólitos provavelmente se unem a proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, resultando em dano nessas macromoléculas (Figura 4). Uma característica particular do BZ é que sua redução não produz espécies reativas de oxigênio (DOCAMPO; MORENO, 1984). Existe evidencia que o BZ induz a morte do *T. cruzi* pela produção do interferon- γ , que é encontrado em quantidades incrementadas devido provavelmente à inflamação causada pelo dano extensivo em macromoléculas (ROMANHA et al., 2002). O DNA em parasitos afetados pelo BZ sofre um extensivo desenrolamento com concorrente superexpressão de proteínas de reparo do DNA, suportando a ideia de que o dano ao nível do DNA contribui para o mecanismo da droga (RAJÃO et al., 2014).

Igual que o BZ, Nifurtimox funciona como pró-droga e deve sofrer ativação por nitroredução. Duas classes de enzimas podem catalisar esse processo, as nitroreductases I e II. NTR-I são proteínas ligadoras a mononucleotídios de flavina (FMN) dependentes de NAD(P)H encontradas comumente em bactérias, mas que aparecem de forma muito rara em eucariotas. Essas nitroreductases interveem na reação de redução de 2 elétrons do grupo nitro para gerar um intermediário nitroso (reação 1) que rapidamente sofre redução a um derivado hidroxilamina (reação 2):



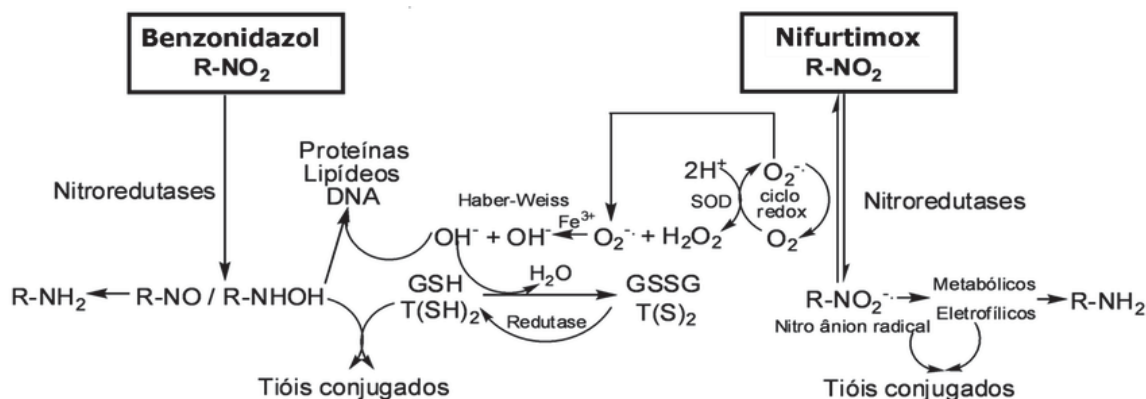


Figura 4. Mecanismo de ação do Bz e NFX. O grupo nitro de ambas drogas antichagásicas é reduzido a radicais livres ou metabólitos eletrofílicos pelas nitroreductases do *T. cruzi*. Os radicais livres derivados do NFX podem sofrer reciclagem redox com o oxigênio e, pela ação posterior da superóxido dismutase, H₂O₂ pode ser produzido. Os radicais livres e metabólitos eletrofílicos ligam em macromoléculas intracelulares, ocasionando efeitos graves e irreversíveis nessas moléculas. Adaptado de (MAYA et al., 2007).

A redução intracelular do NFX gera radicais nitro seguido por reciclagem redox e produção de O₂⁻ e H₂O₂ (Figura 4), considerando-se o principal mecanismo de ação do NFX contra o *T. cruzi* (MAYA et al., 2007).

2.7 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM CEPAS DE *T. cruzi* COM RESISTÊNCIA NATURAL OU INDUZIDA A BENZONIDAZOL

Aproximadamente 93 genes foram reportados associados com mecanismos de resistência ao BZ, com diferentes funções biológicas tais como ativação da droga, transporte, defesa contra espécies reativas de oxigênio e metabolismo, entre outros (ANDRADE et al., 2008; CAMPOS, F. M. F. et al., 2009; NOGUEIRA, Fernanda B. et al., 2009; VILLARREAL et al., 2005). Esses genes atuam em diferentes vias que individual ou sinergicamente resultam em resistência molecular em parasitos submetidos a pressão *in vitro* com a droga, possivelmente como mecanismos estáveis ou transitórios para resistir e sobreviver à ação tripanocida do BZ. No entanto, menos do 5% de esses genes foram validados experimentalmente em relação ao mecanismo de resistência (MEJÍA-JARAMILLO et al., 2011).

Existem na literatura protocolos validados para induzir resistência a BZ *in vitro* (NIRDÉ; LARROQUE; BARNABÉ, 1995) e *in vivo* (MURTA, S. M.; ROMANHA, 1998). Essas populações de parasitos com resistência induzida mostram um perfil diferencial de expressão de alguns genes associados a diferentes vias metabólicas. Uma abordagem na identificação randômica de sequências diferencialmente expressas (RADES) utilizada por Villarreal e colaboradores (VILLARREAL et al., 2005) permitiu identificar algumas bandas diferencialmente amplificadas em populações com resistência induzida a BZ. As análises bioinformáticas mostraram que uma dessas bandas foi um transportador ABC, mas os níveis de identidade não foram significativos (40%). Nogueira e cols. (NOGUEIRA, Fernanda B. et al., 2006) usando uma metodologia de expressão diferencial (RDE) observaram níveis incrementados da enzima superóxido dismutase A (SOD-A) em populações de *T. cruzi* com resistência induzida a BZ. SOD-A remove o excesso de radicais superóxido via dismutação a oxigênio e peróxido de hidrogênio. Por meio de análises proteômicas, Andrade e cols. (ANDRADE et al., 2008) encontraram algumas proteínas com expressão incrementada em populações com resistência induzida a BZ *in vivo* (*calpain-like cysteine peptidase*, *hypothetical protein conserved 26 kDa*, *putative peptidase*, *peroxiredoxin* e *tyrosine amino transferase*) ou *in vitro* (*cyclophilin A*, *glutamate dehydrogenase*, *iron superoxide dismutase* e *nucleoside diphosphate kinase*). Porém, nenhum desses genes foi validado experimentalmente com papel no mecanismo de resistência.

2.8 O PAPEL DAS NITROREDUCTASES NO MECANISMO DE RESISTÊNCIA A BZ E NFX: A SUPEREXPRESSION PODE GERAR SUSCEPTIBILIDADE

Os exemplos mencionados no item anterior ressaltam a importância da superexpressão de alguns genes no mecanismo de sobrevivência do *T. cruzi* a níveis elevados do benzonidazol. Essa superexpressão em geral leva a transporte, degradação ou inativação da droga por mecanismos particulares que dependem da via metabólica em que participa o gene correspondente, e que na maioria dos casos é desconhecida. Porém, existem cenários onde a superexpressão de um gene particular gera susceptibilidade à droga. O melhor exemplo pode ser explicado entre derivados nitroheterocíclicos e nitroreductases nos tripanossomatídeos *T. brucei* e *Leishmania* spp. Como foi mencionado anteriormente, benzonidazol e nifurtimox

são pró-drogas, o que significa que essas enzimas precisam ser ativadas por enzimas intracelulares para serem efetivas. Nitroreductases do tipo I (NTR-I) são uma família de oxidoreductases bacterianas, a maioria delas com função desconhecida, contudo Hall e colaboradores (HALL; BOT; WILKINSON, 2011) encontraram que a superexpressão ectópica da NTR-I teve um papel importante na ação do NFX no *T. brucei*. Eles mostraram que as NTR-I catalisam a redução dessa pró-droga a um derivado nitrila de cadeia aberta insaturado, e que esse produto mostra propriedades inibitórias do crescimento do parasito. Em outro trabalho, o mesmo grupo mostrou que a NTR-I é a principal enzima associada a redução do BZ em *T. cruzi*, e que essa redução leva à formação do agente citotóxico e mutagênico Glyoxal e outros metabolitos citotóxicos (HALL; WILKINSON, 2012), resultados que foram posteriormente confirmados (GONZÁLEZ et al., 2017). Experimentos realizados em *Leishmania donovani* mostraram que a superexpressão da NTR-I levou a níveis incrementados de sensibilidade às drogas NFX e fexinidazol sulfona, outro derivado nitroheterocíclico (WYLLIE et al., 2012).

Apesar de BZ e NFX serem as principais drogas para o tratamento da doença de Chagas, até agora não existem dados na literatura sobre o efeito da superexpressão da NTR-I no *T. cruzi* no contexto da sensibilidade a essas drogas. Existe uma única cópia do gene NTR em *T. cruzi* (TcCLB.510611.60), e já foi demonstrado anteriormente que parasitos com resistência natural ou induzida apresentam mutações na sequência do gene NTR (CAMPOS, M. C. et al., 2017), ou inclusive alelos completos deletados (MEJÍA-JARAMILLO et al., 2011; WILKINSON et al., 2008), (Soares-Medeiros et al 2017), o que ressalta a importância da enzima no mecanismo de ação do BZ. Em *Leishmania donovani* (WYLLIE; PATTERSON; FAIRLAMB, 2013) e *Leishmania major* (VOAK et al., 2013), assim como em *T. brucei* (WILKINSON et al., 2008) a deleção dos dois alelos da NTR-I confere um fenótipo letal para os parasitas. Interessantemente, a perda de um único alelo por seleção *in vitro* com drogas ou por deleção alélica é suficiente para gerar resistência cruzada contra diferentes drogas nitroheterocíclicas, tanto em *T. cruzi* como em *T. brucei* (WILKINSON et al., 2008). Esses resultados em conjunto mostram o papel importante da NTR-I no contexto da resistência a drogas nitroheterocíclicas.

Além da NTR-I, outros genes parecem estar associados ao metabolismo do BZ. A prostaglandina F2A sintetase ou *Old Yellow Enzyme* (OYE) também mostrou níveis diminuídos de RNA mensageiro (MEJÍA-JARAMILLO et al., 2011) ou redução em número de cópias em parasitos com resistência natural ou induzida a BZ (MURTA, S. M. F. et al., 2006). TcOYE é uma flavina oxidoreductase que em *T. cruzi* catalisa a síntese de prostaglandina PGF2a e a redução de uma variedade de drogas tripanocidas, tais como naftoquinona e compostos nitroheterocíclicos. Quando a proteína é imunoprecipitada a partir de lisados de epimastigotas a maior parte da sua atividade é abolida, demonstrando que TcOYE é uma enzima chave metabolizadora de drogas (KUBATA et al., 2002).

Os trabalhos mostraram apenas uma parte da história da resistência ao benzonidazol, relacionado com níveis de expressão alterada em populações de parasitas com resistência natural ou induzida à droga. No entanto, recentemente Campos e colaboradores (CAMPOS, M. C. et al., 2017) mostraram que o mecanismo de resistência pode acontecer não necessariamente por variação em níveis de expressão, mas sim em variação ao nível de sequência. Eles sequenciaram 3 clones derivados de uma população da cepa Y submetida a pressão com benzonidazol e encontraram uma série de mutações distribuídas por todo o genoma, principalmente associadas a genes de reparo de DNA. Também, foi evidente que esses clones apresentavam alterações no número de cópias de alguns genes, a maioria deles codificadores de produtos hipotéticos, cinesinas e histona H2A, entre outros.

3 JUSTIFICATIVA

O agente etiológico da doença de Chagas, o parasito *Trypanosoma cruzi*, foi descoberto há mais de 100 anos pelo médico Brasileiro Carlos Chagas. A partir dessa época, extensivas pesquisas têm sido desenvolvidas com a finalidade de controlar a doença, que cada ano ocasiona 10 mil mortes no mundo. Porém, até a data recente não existe uma vacina disponível e unicamente a quimioterapia usando duas drogas com eficácia restrita a fase aguda da doença é a forma de controlar os sintomas dessa enfermidade. Com os recentes avanços e continuo desenvolvimento das novas tecnologias “ômicas”, grandes contribuições tem acontecido nos últimos anos, podendo contar hoje com vários sequenciamentos de diferentes cepas do *T. cruzi* na base de dados dos Tripanossomatídeos (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>). Esses avanços sem dúvida nenhuma vão permitir dar um salto importante na área da genômica funcional em larga escala neste parasita historicamente difícil de manipular pelas técnicas convencionais usadas em eucariotos.

A pesar de abordagens poderosas para explorar função gênica tenham sido aplicadas em outros organismos, incluindo outros membros da família *Trypanosomatidae* (BEGOLO; ERBEN; CLAYTON, 2014;COTRIM; GARRITY; BEVERLEY, 1999), até agora não existem trabalhos em larga escala usando bibliotecas de superexpressão em *T. cruzi*. Essa escassez de trabalhos não permite contribuir para o descobrimento de função de muitos dos genes do *T. cruzi*, um parasito de quem desconhecemos a função de quase a metade dos seus genes. É necessário, por tanto, começar a explorar o poder dessas abordagens em larga escala genômica em *T. cruzi*, com a finalidade de responder diferentes perguntas biológicas relevantes do parasito.

Dois principais fatores limitantes da execução dessas metodologias de superexpressão em larga escala é a ineficiente transfecção de DNA em diferentes formas do parasito por meio de eletroporação, um assunto que terá que ser abordado antes de poder começar a executar esse tipo de trabalhos. Usando metodologias convencionais, eficiências de transfecção transientes inferiores a 10% são conseguidas (DAROCHA; SILVA et al., 2004), com elevadas taxas de morte celular. Porém, outras plataformas têm sido desenvolvidas em anos recentes e aplicadas em *T. cruzi*, conseguindo melhorar essas eficiências de transferência de DNA, mas ainda com eficiências inferiores a 13% das células transfectadas

(XU et al., 2009). É necessário investir em protocolos de otimização para tentar melhorar a transferência de ácidos nucleicos em formas replicativa e não replicativa do parasito, com a finalidade de poder desenhar e aplicar abordagens em larga escala genômica.

Sistemas induzíveis para a regulação da expressão genica em diferentes formas do parasito *T. cruzi* não funcionam ou são bastante ineficientes diferente do que acontece em *T. brucei* onde a regulação por tetraciclina funciona de forma altamente eficiente. Essa carência de sistemas regulados de expressão gênica também tem dificultado descobrir a função de muitos dos genes do parasita *T. cruzi*, principalmente porque não é possível avaliar de forma controlada o efeito da superexpressão ou nocaute de genes particulares. É necessário desenhar novos sistemas de regulação gênica controlada que permitam avaliar o efeito da manipulação de um gene particular em tempos determinados durante as diferentes fases do ciclo de vida do parasito.

Levando a consideração o exposto anteriormente, neste trabalho focamos nossos esforços em poder contribuir em 3 frentes principais relacionados com abordagens funcionais que permitirão em um futuro desenvolver estudos em larga escala genômica em *Trypanosoma cruzi*: 1) exploraremos novos protocolos otimizados para tentar melhorar as condições de transfecção transiente em *T. cruzi*. 2) Desenharemos e implementaremos estratégias de fenotipagem em larga escala usando bibliotecas de superexpressão de *Open Reading Frames (ORFs)*, focadas no descobrimento de genes associados a resistência a drogas, usando o novo protocolo otimizado de eletroporação ressaltado no ponto número 1, e 3) desenharemos uma abordagem baseada em recombinação para induzir de forma condicional a expressão de genes exógenos em *T. cruzi*, e avaliaremos sua funcionalidade para editar genes em diferentes formas do parasito.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL:

- DESENVOLVER ESTRATÉGIAS DE GENÔMICA FUNCIONAL APLICÁVEIS A ABORDAGENS EM LARGA ESCALA EM *Trypanosoma cruzi* UTILIZANDO O FENÔMENO DE RESISTÊNCIA/SUSCEPTIBILIDADE A DROGAS COMO MODELO.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Otimizar as condições de transfecção transiente em *Trypanosoma cruzi*.
2. Desenhar e construir bibliotecas de *Open Reading Frames* (ORFs) usando a estratégia de clonagem *Gateway*®.
3. Gerar populações de *Trypanosoma cruzi* recombinantes expressando ORFs individuais em formas epimastigotas do parasita.
4. Implementar um protocolo de seleção de parasitos resistentes a benzonidazol devido a superexpressão de genes/ORFs específicos.
5. Validar de forma individual as ORFs encontradas associadas a fenótipos de resistência ao benzonidazol.
6. Desenvolver um sistema baseado em recombinação para expressão gênica regulada em *Trypanosoma cruzi*.

5 RESULTADOS.

Capítulo I

Artigo publicado

Effective gene delivery to *Trypanosoma cruzi* epimastigotes through Nucleofection

Parasitology International. 2017 Jun;66(3):236-239.

doi: 10.1016/j.parint.2017.01.019.

ABSTRACT

New opportunities have raised to study the gene function approaches of *Trypanosoma cruzi* after its genome sequencing in 2005. Functional genomic approaches in *Trypanosoma cruzi* are challenging due to the reduced tools available for genetic manipulation, as well as to the reduced efficiency of the transient transfection conducted through conventional methods. The Amaxa nucleofector device was systematically tested in the present study in order to improve the electroporation conditions in the epimastigote forms of *T. cruzi*. The transfection efficiency was quantified using the green fluorescent protein (GFP) as reporter gene followed by cell survival assessment. The herein used nucleofection parameters have increased the survival rates (>90%) and the transfection efficiency by approximately 35%. The small amount of epimastigotes and DNA required for the nucleofection can turn the method adopted here into an attractive tool for high throughput screening (HTS) applications, and for gene editing in parasites where genetic manipulation tools remain relatively scarce.

Keywords: Transfection, nucleofection, electroporation, *Trypanosoma cruzi*

BACKGROUND

Eight (8) to 10 million people in 21 endemic countries are infected with *Trypanosoma cruzi*, and 30% of these infected patients develop Chagas disease symptoms. This neglected tropical disease lacks an efficient treatment with reduced side effects (COURA; VIÑAS, 2010). The first version of the complete genome of *T. cruzi* was published almost a decade ago (EL-SAYED et al., 2005), and showed an estimate of 12,000 genes per haploid genome. Approximately 50 % of these genes have unknown function and those genes with predicted function can perform additional activities. Although the genome sequence and transcriptomic data allow identifying the *T. cruzi* genes and their expression profile, new approaches are needed in order to determine gene function. Unlike what happens with *Trypanosoma brucei* (NGÔ et al., 1998), the RNAi machinery in *T. cruzi* is not functional (DAROCHA; OTSU et al., 2004), and it has deeply limited the high throughput functional genomics through RNA silencing. The RNAi approach has allowed large scale analysis in *T. brucei*, for example: Subramaniam *et al.* (SUBRAMANIAM et al., 2006) silenced all genes in chromosome I and

searched for growth defects. Additionally, since the first report using *T. brucei* random RNAi library (MORRIS et al., 2002), elegant studies have been elucidating different aspects of *T. brucei* biology, such as drug resistance and *quorum* sensing (ALSFORD et al., 2011; 2012). Regarding *T. cruzi*, gene overexpression remains the main strategy to characterize genes, followed by the conventional gene knockout, which is too laborious. However, recent tests of the CRISPR-Cas9 system have evidenced that such system is a very promising tool in this organism (LANDER et al., 2015; PENG et al., 2015), and that can be improved under better transfection conditions (BURLE-CALDAS et al., 2015).

The transfection of different forms from *T. cruzi* with DNA vectors has become a widely used and powerful tool to investigate both gene regulation and gene function, in order to cause phenotypic changes. However, *T. cruzi* is considered a “hard-to-transfect” parasite, which shows relatively low transfection efficiency through conventional electroporation. However, recent publications have shown the potential of the nucleofector technology to improve the transfection efficiency in *T. brucei* (BURKARD; FRAGOSO; RODITI, 2007; SCHUMANN BURKARD; JUTZI; RODITI, 2011) and, more recently, in *T. cruzi* trypomastigotes (PADMANABHAN et al., 2014). Such results have encouraged the systematic assessment of this transfection methodology in the epimastigote forms of *T. cruzi*. Accordingly, the main aim of the present report is to evaluate the transfection efficiency in *T. cruzi* using the nucleofector technology under different conditions.

RESULTS

Previous transfection efficiency between 4% and 8% was reported in the epimastigote forms of *T. cruzi* when it was assessed 24 hours-post transfection, using 30 and 60 µg of DNA, respectively, through conventional electroporation protocols (DAROCHA; SILVA et al., 2004). In order to increment parasite transfection efficiency, 2.0 x 10⁷ G strain epimastigotes in exponential growth phase were transfected with 10 µg of pTREXn-GFP vector (VAZQUEZ; LEVIN, 1999) in the electroporation buffer 1X Tb-BSF (SCHUMANN BURKARD; JUTZI; RODITI, 2011), using different programs in the nucleofector apparatus. The U-033 and X-014 programs generated the highest transfection efficiency (between 12-

15%), which is similar to the transfection efficiency reported by Xu et al. (XU et al., 2009) (Figure 1A). Although the U-014 and Z-001 programs have been used in hard-to-transfect cells (SU et al., 2016), they were not efficient enough, because they just produced transfection efficiency below 4% (Fig 1A). However, all programs tested with the Amaxa device yielded high survival rates (92 to 97% - 24 hpt) as shown through propidium iodide staining (Fig 1A). It should be noticed that the cell viability, shortly after transfection (5 h), was also high; thus presenting survival rates between 90% to 97% (data not shown). The X-001, T-007 and Z-001 programs were also tested in the present study, however, none of them has generated transient transfection efficiency above 5% (data not shown). The following condition was tested in order to compare the transient transfection efficiency obtained here with the conventional electroporation protocol, which was carried as follows: a total of 4.0×10^7 epimastigotes were washed once and resuspended in 400 μ L of ice-cold Cytomix buffer containing 50 μ g of pTREX-GFP plasmid in 2-mm electroporation cuvettes with two pulses (450 V, 500 μ F) delivered by the GenePulser II (BioRad) (DAROCHA; SILVA et al., 2004). As shown in figure 1A, the transfection efficiency was lower than that observed in the nucleofector device, which reached less than 5% of transfection efficiency and reduced cell viability (68% -24 hpt). In order to test if the aforementioned difference in performance could be due to the buffer composition, the epimastigotes were transfected in Tb-BSF buffer using the GenePulser II protocol, which did not increase the transfection efficiency, nor cell viability (Fig 1A). It is worth highlighting that the results for transfection rate (% of fluorescent cells) were supported by the mean fluorescence intensity (Fig 1B). The percentage of fluorescent cells herein obtained with *T. cruzi* epimastigotes are in the same range reported for the procyclic forms of *T. brucei* using the Amaxa (10% and 20% using the programs U-033 and X-014) (Burkard et al. 2007). It is important pinpointing that the transfection of non-replicative forms (trypomastigote) is less efficient than that of the epimastigotes (PADMANABHAN et al., 2014).

Subsequently, there was the interest in investigating whether the transient transfection efficiency could be improved by rising the DNA amount. When the DNA amount was increased to 20 μ g, there was transfection efficiency increase, which has reached the fluorescent cell percentage up to 35%, when it was analyzed 48 hours after transfection (Fig 1C). In addition, twofold increase was observed in the mean fluorescence intensity when the

DNA amount was raised to 20 µg (Fig 1D). Of note, neither the transfection efficiency nor the mean fluorescence intensity have increased when 40 µg of DNA was used (Fig 1C and 1D).

Aiming to test if the buffer composition could impact in the transfection efficiency, several homemade buffers, previously tested to transfect primary T cells using the Amaxa (CHICAYBAM et al., 2013), were used in *T. cruzi*. The T cells, such as *T. cruzi*, are considered hard to transfect and the cell viability after their transfection is very low. As shown in the table 1, any of the herein used homemade buffers could improve the transient transfection when the GFP expression was assessed 24 hours after transfection. In addition, the transfections conducted using some of these buffers (Tc-EF2 and Tc-EF3 buffers) have seriously compromised the cell viability, and it has revealed that the electroporation buffer composition of plays an important role in the transfection process.

Since the success of the transfection depends on the efficient delivery of the DNA into the nucleus, and on the cellular machinery, to express its information, we decide to analyze the cell permeabilization using a fluorescent marker (FITC-Dextran – 150 kDa). All tested programs and transfection protocols labeled more than 60% of the cells through the fluorescent marker FITC-dextran staining, when they were compared to untransfected cells incubated in FITC-dextran (Figure 2). The reason why the cells electroporated in GenePulser II device have generated the highest cell-labelling rate is unknown, but it is assumed that it may have generated either more or bigger pores in the plasma membrane than the nucleofection, fact that may explain the lower survival rate, or cell death caused higher labeling. Anyway, the FITC-Dextran labeling was higher than GFP expression obtained through DNA transfection, thus explaining the gene silencing efficiency generated through the sgRNA transfection using CRISPR-Cas9 system in *T. cruzi* described by Peng et al (PENG et al., 2015). Thus, the X-014 program is better than U-014 for both DNA constructs and small molecules, such as FITC-Dextran, based on transfection rate and cell survival.

After systematically testing the electroporation protocols, it was found that the Amaxa Nucleofector technology leads to the more effective and faster transfection of epimastigote forms of *T. cruzi* than that of the conventional electroporation conducted in a GenePulser II device (BioRad). The improved transfection efficiency reported here strongly

reduced the selection time (2 weeks – data not shown) and the amount of material required to generate transfected parasites, i.e., the amount of DNA and cells. The improved transfection protocol herein described is a key method to successfully apply new tools, such as the genome editing using CRISPR-Cas9 system, as well as to achieve high throughput genome manipulation.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) and the CAPES agency. The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health (PDTIS) for use of the flow cytometry facility (RPT08L) at Carlos Chagas Institute—FIOCRUZ/PR, especially to Priscila Mazzocchi Hiraiwa for the technical assistance in the BD FACSAria™ II flow cytometer (BD Biosciences, USA). We also are grateful with Axel Rulf Cofré for the technical assistance with the nucleofector.

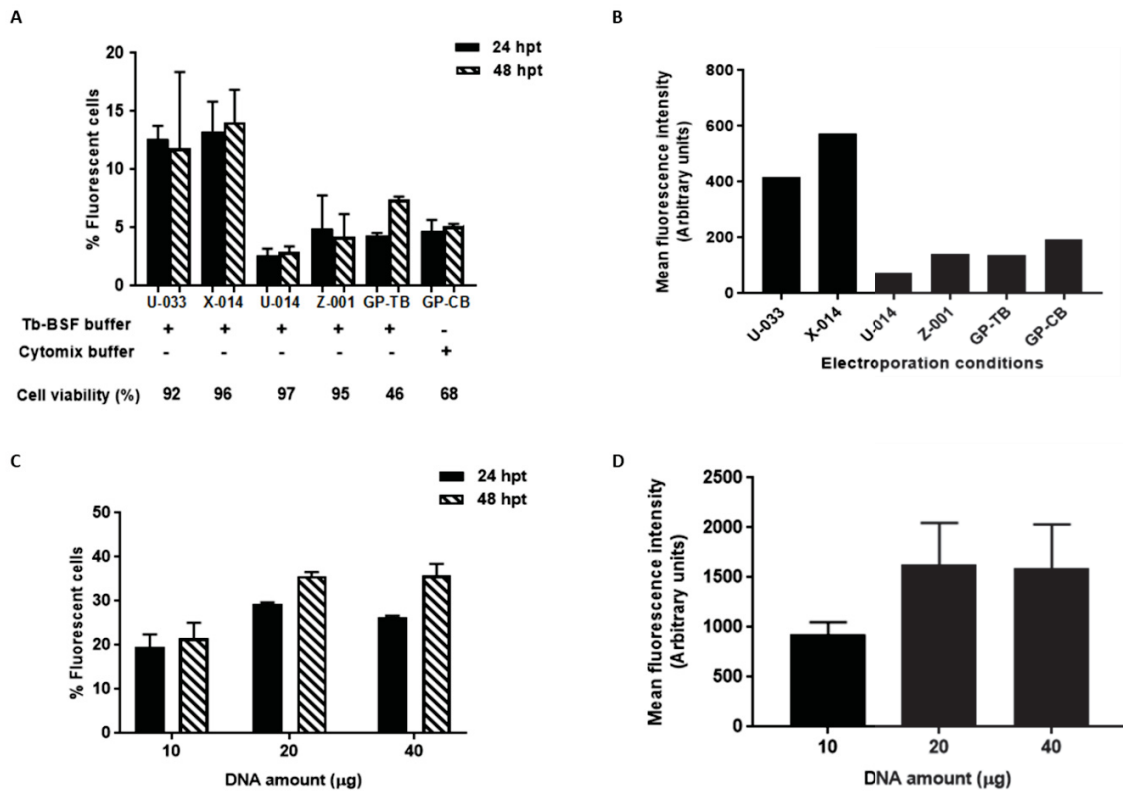


Figure 5. Transient transfection efficiency in epimastigote forms from *Trypanosoma cruzi* using different electroporation conditions. (A) 2.0×10^7 epimastigote forms of G strain in exponential growth phase were washed once and resuspended in 100 μ L of 1X Tb-BSF buffer and mixed with 10 μ g of pTREX-GFP vector. The parasites were transferred to 2 mm gap cuvettes and electroporated using U-033, U-014, X-014 and Z-001 programs in the Amaxa Nucleofector 2b (Lonza Cologne AG, Germany). In parallel, 4.0×10^7 parasites were electroporated in GenePulser II equipment (BioRad), using the Tb-BSF buffer (GenePulser-TbBSF buffer, GP-TB), or in Cytomix buffer (GenePulser-Cytomix buffer, GP-CB). After transfection, the parasites were transferred to 5 mL of LIT medium supplemented with 10% FCS and incubated at 28°C. The flow cytometry analyses were carried out in order to assess the green fluorescent protein expression at 24 and 48 hours after transfection (hpt). (B) The mean fluorescence intensity was evaluated 24 hpt in each one of the transfection conditions used in A (a representative experiment is shown). (C) Epimastigote forms were transfected with 10, 20 or 40 μ g of the pTREX-GFP vector using the X-014 program according to the transfection conditions set in panel A. The GFP expression was measured by flow cytometry 24 and 48 hpt. (D) The mean fluorescence intensity was measured at 24 hpt of the same transfections shown in C. These values were normalized according to those for mock-transfected parasites and were presented through the means (\pm SDM) of three independent experiments.

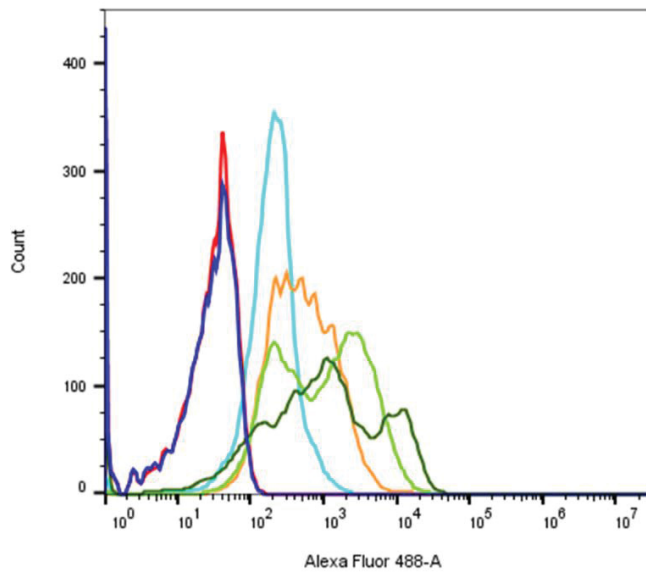


Figure 6. Epimastigote permeabilization by different electroporation protocols using FITC-Dextran. 2.0×10^7 parasites in exponential growth phase were incubated with $840 \mu\text{g}$ of the fluorescent marker FITC-Dextran (150 kDa) in 1X Tb-BSF buffer, and were immediately electroporated using Amaxa nucleofector (X-014 and U-014 programs, light green and orange histograms, respectively), or GenePulser II device (GenePulser – FITC, dark green histogram) in the same conditions as mentioned in Fig 1A. After electroporation, cells were extensively washed with PBS 1X to remove external FITC-Dextran and analyzed by flow cytometry. Untransfected parasites were incubated on ice with FITC-Dextran to estimate the FITC-Dextran labeling that is not dependent of transfection (Untransfected – FITC, cyan histogram). Cells mock transfected using Amaxa nucleofector (Mock Nucleofection, blue histogram), or GenePulser II (Mock GenePulser, red histogram) were included as negative controls for self-fluorescence.

Tabela 1. Effects of buffer composition on transient transfection efficiency.

Electroporation Buffer	Buffer composition	% fluorescent cells (24 hpt)	Cell viability ^a (%)
Tc-EF1	5 mM KCl, 15 mM MgCl ₂ , 150 mM Na ₂ HPO ₄ , 15 mM HEPES, 50 mM Mannitol, pH 7,2	2.5	95
Tc-EF2	5 mM KCl, 15 mM MgCl ₂ , 120 mM Na ₂ HPO ₄ , 50 mM Mannitol, pH 7,2	3.4	62
Tc-EF3	5 mM KCl, 15 mM MgCl ₂ , 120 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,2	2.7	53
Tc-EF4	5 mM KCl, 15 mM Mg Cl ₂ , 100 mM Na ₂ HPO ₄ , 20 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 7,2	1.2	91
Tc-EF5	2.8 mM KCl, 4 mM MgCl ₂ , 20 mM HEPES, 140 mM NaCl, 40 mM glucose, 2 mM CaCl ₂ , pH 7,2	7.3	91
Tc-EF6	Tb-BSF ^b , 50 mM Mannitol	11.7	92

^a Determined by propidium iodide staining 24 h post transfection (24 hpt)

^bTb-BSF buffer composition: 5mM KCl, 0,15 mM CaCl₂, 90 mM Na₂HPO₄, 50 mM HEPES, pH 7.3

REFERENCES

ALSFORD, S. et al. **High-throughput phenotyping using parallel sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome.** *Genome Research*, [s.l.], v. 21, n^o 6, p. 915–924, 2011. ISSN: 1549-5469, DOI: 10.1101/gr.115089.110.

_____. **High-throughput decoding of antitrypanosomal drug efficacy and resistance.** *Nature*, [s.l.], v. 482, n^o 7384, p. 232–236, 2012. ISSN: 1476-4687, DOI: 10.1038/nature10771.

BURKARD, G.; FRAGOSO, C. M.; RODITI, I. **Highly efficient stable transformation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, [s.l.], v. 153, n^o 2, p. 220–223, 2007. ISSN: 01666851, DOI: 10.1016/j.molbiopara.2007.02.008.

BURLE-CALDAS, G. de A. et al. **Expanding the tool box for genetic manipulation of *Trypanosoma cruzi*.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, [s.l.], v. 203, n^o 1–2, p. 25–33, 2015. ISSN: 01666851, DOI: 10.1016/j.molbiopara.2015.10.004.

CHICAYBAM, L. et al. **An Efficient Low Cost Method for Gene Transfer to T Lymphocytes.** *PLoS ONE*, [s.l.], v. 8, n° 3, p. e60298, 2013. ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0060298.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. **Chagas disease: a new worldwide challenge.** *Nature*, [s.l.], v. 465, n° n7301_supp, p. S6–S7, 2010. ISSN: 0028-0836, 1476-4687, DOI: 10.1038/nature09221.

DAROCHA, W. D.; SILVA, R. A. et al. **Expression of exogenous genes in Trypanosoma cruzi : improving vectors and electroporation protocols.** *Parasitology Research*, [s.l.], v. 92, n° 2, p. 113–120, 2004. ISSN: 0932-0113, 1432-1955, DOI: 10.1007/s00436-003-1004-5.

DAROCHA, W. D.; OTSU, K. et al. **Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in Trypanosoma cruzi.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, [s.l.], v. 133, n° 2, p. 175–186, 2004. ISSN: 0166-6851.

EL-SAYED, N. M. et al. **The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease.** *Science (New York, N.Y.)*, [s.l.], v. 309, n° 5733, p. 409–415, 2005. ISSN: 1095-9203, DOI: 10.1126/science.1112631.

LANDER, N. et al. **CRISPR/Cas9-Induced Disruption of Paraflagellar Rod Protein 1 and 2 Genes in Trypanosoma cruzi Reveals Their Role in Flagellar Attachment.** *mBio*, [s.l.], v. 6, n° 4, p. e01012-15, 2015. ISSN: 2150-7511, DOI: 10.1128/mBio.01012-15.

MORRIS, J. C. et al. **Glycolysis modulates trypanosome glycoprotein expression as revealed by an RNAi library.** *The EMBO journal*, [s.l.], v. 21, n° 17, p. 4429–4438, 2002. ISSN: 0261-4189.

NGÔ, H. et al. **Double-stranded RNA induces mRNA degradation in Trypanosoma brucei.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [s.l.], v. 95, n° 25, p. 14687–14692, 1998. ISSN: 0027-8424.

PADMANABHAN, P. K. et al. **Transient transfection and expression of foreign and endogenous genes in the intracellular stages of Trypanosoma cruzi.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, [s.l.], v. 198, n° 2, p. 100–103, 2014. ISSN: 01666851, DOI: 10.1016/j.molbiopara.2015.02.001.

PENG, D. et al. **CRISPR-Cas9-mediated single-gene and gene family disruption in *Trypanosoma cruzi***. *mBio*, [s.l.], v. 6, n° 1, p. e02097-02014, 2015. ISSN: 2150-7511, DOI: 10.1128/mBio.02097-14.

SCHUMANN BURKARD, G.; JUTZI, P.; RODITI, I. **Genome-wide RNAi screens in bloodstream form trypanosomes identify drug transporters**. *Molecular and Biochemical Parasitology*, [s.l.], v. 175, n° 1, p. 91–94, 2011. ISSN: 01666851, DOI: 10.1016/j.molbiopara.2010.09.002.

SU, S. et al. **CRISPR-Cas9 mediated efficient PD-1 disruption on human primary T cells from cancer patients**. *Scientific Reports*, [s.l.], v. 6, p. 20070, 2016. ISSN: 2045-2322, DOI: 10.1038/srep20070.

SUBRAMANIAM, C. et al. **Chromosome-wide analysis of gene function by RNA interference in the african trypanosome**. *Eukaryotic Cell*, [s.l.], v. 5, n° 9, p. 1539–1549, 2006. ISSN: 1535-9778, DOI: 10.1128/EC.00141-06.

VAZQUEZ, M. P.; LEVIN, M. J. **Functional analysis of the intergenic regions of TcP2beta gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector**. *Gene*, [s.l.], v. 239, n° 2, p. 217–225, 1999. ISSN: 0378-1119.

XU, D. et al. **Evaluation of high efficiency gene knockout strategies for *Trypanosoma cruzi***. *BMC Microbiology*, [s.l.], v. 9, n° 1, p. 90, 2009. ISSN: 1471-2180, DOI: 10.1186/1471-2180-9-90.

Capítulo II

**DESENHO E CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS DE SUPEREXPRESSÃO DE
ORFs PARA IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS GENES RELACIONADOS A
RESISTÊNCIA A DROGAS EM *T. cruzi*.**

RESUMO

Background: O sequenciamento genômico do *Trypanosoma cruzi* no ano 2005 abriu um cenário importante no contexto da biologia básica desse protozoário, revelando detalhes anteriormente desconhecidos principalmente relacionados com a estrutura genômica. Apesar dos avanços notáveis que vieram depois da publicação desses dados de sequenciamento, principalmente relacionados com estudos de genômica funcional, ainda a metade do genoma do *T. cruzi* permanece catalogado como gene hipotético. Abordagens em larga escala genômica tanto de perda (p.ex. RNAi) quanto de ganho de função (p.ex. bibliotecas de superexpressão) tem permitido explorar com grande sucesso a função de muitos genes em *T. brucei*. Porém, essas abordagens não têm sido desenvolvidas em *T. cruzi*, um parasito que carece de um mecanismo funcional de RNAi e onde as bibliotecas de superexpressão não têm sido exploradas ao nível funcional. Nesse capítulo reportamos o desenho e construção de bibliotecas de Open Reading Frames (ORFs) usando plataforma Gateway®, e avaliamos funcionalmente essa biblioteca em um protocolo de seleção de parasitos resistentes a benzonidazol, a principal droga usada para o tratamento da doença de Chagas. *Métodos:* 3380 ORFs clonadas em pENTR foram transferidas para um vetor de expressão baseado em pTREX e eletroporadas em formas epimastigotas da cepa G de *T. cruzi*. Essas populações carregando o ORFoma foram tratadas com benzonidazol por 15 semanas e em diferentes tempos pós-tratamento foram realizadas genotipagens por PCR para identificar perfis de amplificação em populações teste (com droga) e controles (sem droga). *Resultados:* Inicialmente abordamos uma pergunta relevante para a nossa estratégia relacionada com o número de cópias que o vetor pTREX pode integrar por parasito. Por eletroporação com plasmídios carregando genes repórteres distintos e a mesma resistência a G418, identificou-se que o vetor pTREX integra preferencialmente uma cópia por genoma. As populações carregando o ORFoma mostraram uma aparente baixa representatividade de clones, baseado em amplificação por PCR. Apesar dessa baixa representatividade, conseguimos identificar e validar a ORF RNP-U2 como potencialmente associada a resistência a benzonidazol. *Conclusão:* Reportamos a primeira tentativa em larga escala genômica usando bibliotecas de ORFs em *T. cruzi*. Essa abordagem permitiu identificar a ORF RNP-U2 como provavelmente associada ao mecanismo de resistência a benzonidazol. Discutimos a relevância dessa estratégia e as possibilidades de otimização.

Palavras chave: *Trypanosoma cruzi*, bibliotecas de ORFs, benzonidazol, RNP-U2

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma endemia da América Latina acometendo ~10 milhões de pessoas no mundo (2015) , destes, ~2 milhões residem no Brasil (Sec. de Vigilância em Saúde, MS (SEC DE VIG EM SAÚDE-MS, 2010). O protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico dessa patologia, pertence a classe Kinetoplastea que engloba os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*. Stuart *et. al.* estimaram que 20 milhões de indivíduos estejam infectados por parasitos dessa classe, o que coloca ~0,5 bilhões de pessoas sob risco de contrair esses patógenos (STUART *et al.*, 2008). Esses protozoários causam a doença de Chagas, a doença do sono (*T. brucei*), e diversas manifestações clínicas de leishmaniose (*Leishmania* spp.). Este conjunto de doenças negligenciadas causadas por estes parasitos ocasiona ~100.000 mortes/ano, principalmente em áreas tropicais e subtropicais (STUART *et al.*, 2008). Apesar do grande impacto econômico causado por essas doenças, fármacos efetivos para eliminação desses parasitos estão ausentes ou são inadequados (PEDRIQUE *et al.*, 2013). Embora esses parasitos sejam transmitidos por distintos insetos vetores e causem doenças com quadros clínicos distintos, vários aspectos de sua biologia celular e molecular são semelhantes, por exemplo estruturas celulares (glicosomo, flagelo e kinetoplasto) (STUART *et al.*, 2008). Análises *in silico* mostram compartilhamento de ~6.000 genes entre estes parasitos, sendo que 50% dos genomas codificam proteínas hipotéticas sem ortólogos em humanos (ASLETT *et al.*, 2010;STUART *et al.*, 2008;TEIXEIRA *et al.*, 2012). Desta forma é possível que fármacos que alvejem proteínas do core (*T.cruzi*, *T.brucei*, e *Leishmania* spp.) possam ter efeito em múltiplas espécies.

Apenas os fármacos Nifurtimox e Benzonidazol têm sido utilizados no tratamento da doença de Chagas, contudo a eficácia continua controverso (URBINA, 2010) e ainda apresentam efeitos colaterais severos, p.ex., toxicidade ao SNC, leucopenia, fraqueza muscular e dermatite severa, podendo ter efeito carcinogênico (ALSFORD *et al.*, 2013). Além disso, vários trabalhos reportam isolados naturalmente resistentes aos fármacos para doença de Chagas (FILARDI; BRENER, 1987), ou parasitos selecionados pela resistência *in vitro* (MURTA, S. M. F. *et al.*, 2008;NIRDÉ; LARROQUE; BARNABÉ, 1995;VILLARREAL *et al.*, 2005). Este cenário reforça a necessidade de formas mais eficientes para o tratamento da doença. Neste sentido, alguns grupos têm testado tratamento

com combinação de fármacos que pode resultar em redução de dose, acarretando em redução dos efeitos colaterais (BUSTAMANTE et al., 2014; DINIZ et al., 2013).

Neste capítulo focaremos nossos esforços no desenvolvimento de uma estratégia de identificação de mecanismos de resistência do *T. cruzi* ao Benzonidazol utilizando uma abordagem de genômica funcional refinada em larga escala. Nesta estratégia propõe-se a utilização de bibliotecas de superexpressão de ORFs de *T. cruzi* no próprio *T. cruzi*. Uma abordagem similar foi utilizada em *T. brucei*, porém utilizando fragmentos genômicos aleatórios (BEGOLO; ERBEN; CLAYTON, 2014). Afim de viabilizar essa estratégia, é essencial o desenvolvimento de um vetor de expressão em *T. cruzi* alterando-se vetores convencionais para conter sítios de recombinação baseadas na estratégia Gateway®, flanqueadas por sequências para o correto processamento do mRNA (intergênicas). Além disso, pode-se incluir sequências para realização de protocolos de sequenciamento direcionado em larga-escala (*High throughput Targeting Sequencing* - RIT-seq) (ALSFORD et al., 2011).

A estratégia em larga escala implementada neste trabalho está baseada na construção de bibliotecas de superexpressão de *Open Reading Frames* (ORFs) para posteriores análises funcionais em larga escala em *T. cruzi* (inicialmente resistência a drogas). Nesse sentido, nosso grupo estabeleceu uma parceria com o grupo do Dr. Christian Macagnan Probst do Instituto Carlos Chagas, Fiocruz Paraná. Este grupo tinha amplificado e clonado no sistema Gateway® 3380 ORFs (de 8000) tendo sido reduzida a redundância de genes pela identificação de ORFs consenso para um grupo de parálogos, removendo-se os genes que codificam famílias multigênicas de superfície previamente descritas. Todas as 3380 ORFs derivaram do genoma do clone Dm28c de *T. cruzi* (trabalho em preparação para publicação) cujo genoma já está disponível em diferentes versões (BERNÁ et al., 2018; GRISARD et al., 2014). Uma vez que tínhamos mais de 1/3 do ORFoma de *T. cruzi* clonados em vetor pDONR (pENTRY clones), decidimos avaliar se a superexpressão dessas ORFs nos permite selecionar aquelas que estejam relacionadas com resistência a Benzonidazol. A figura 7 mostra a estratégia geral de clonagem Gateway® usado para a montagem do ORFoma nessa plataforma.

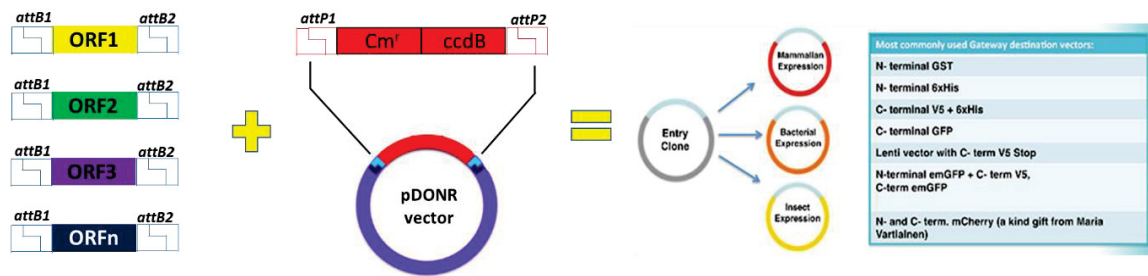


Figura 7. Esquema geral da estratégia de clonagem Gateway®. 3380 ORFs foram amplificadas da cepa Dm28c de *T. cruzi* com primers contendo os sítios *attachment B* (*attB*) flanqueando cada um das ORFs. Os produtos de amplificação foram clonados no vetor pDONR221 usando a enzima BP clonase que facilitará a recombinação entre os sítios *attB* e *attP*. Da clonagem em vetor pDONR foram coletadas 4 clones independentes para cada ORF, com a finalidade de aumentar a chance de ter uma ORF funcional em pENTRY. Esses 4 clones foram misturados para gerar um único pool que contém os clones agrupados.

RESULTADOS

DESENHO E CONSTRUÇÃO DO VETOR DE SUPEREXPRESSION COMPATÍVEL COM A PLATAFORMA GATEWAY®

Para superexpressar cada uma das ORFs clonadas em vetores de entrada (pENTR clones) foi construído um vetor destino baseado em pTREX compatível com a estratégia de clonagem Gateway® (pTREX-GW-Neo – *Destination vector – for T. cruzi overexpression*). Três razões nos motivaram a construir esta estratégia desta forma, são elas: 1) pTREX permite a expressão em todas as fases do *T. cruzi*; 2) este vetor poder ser transfectado na forma circular e é mantido estável; e 3) o sistema Gateway® não depende de enzimas de restrição para a clonagem, o que torna o processo menos laborioso e pode ser aplicado a larga escala. A figura 8A mostra um esquema geral do vetor pTREX-GW-Neo com os sítios de recombinação e as características principais desse vetor destino.

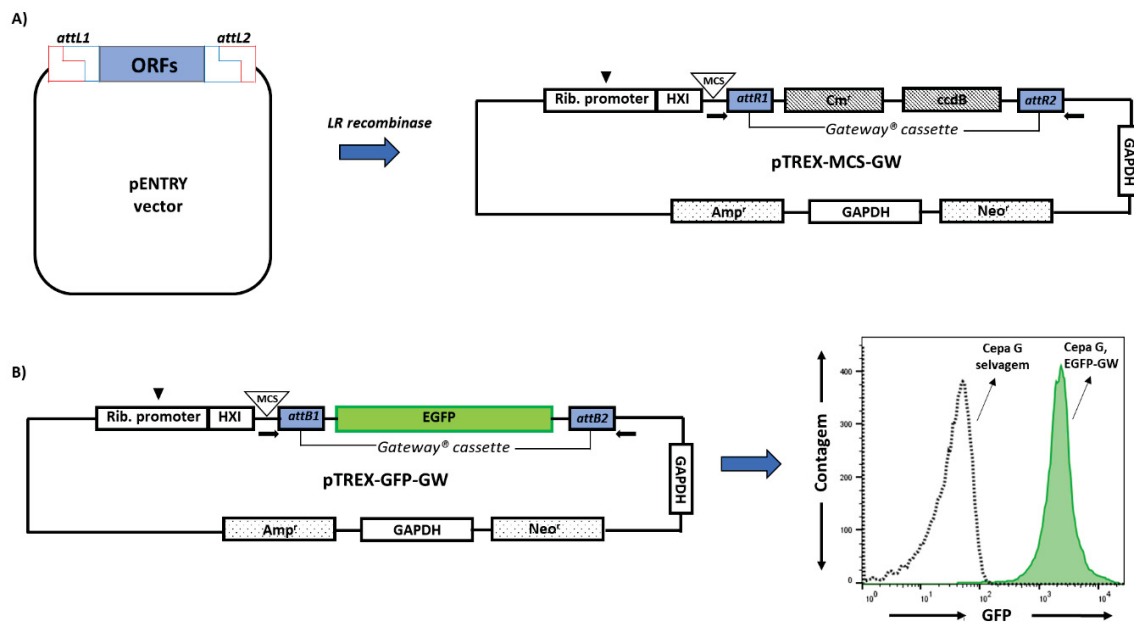


Figura 8. Estratégia geral de clonagem da biblioteca de ORFs no vetor pTREX-GW-Neo. A) O ORFoma previamente clonado em vetores de entrada foi transferido por recombinação LR usando o sistema Gateway para o vetor pTREX-GW-Neo, que contém o cassette Cloranfenicol-ccdB útil para seleção positiva de clones recombinantes. **B)** A sequência codificadora da proteína fluorescente verde (EGFP) foi transferida por recombinação LR ao vetor pTREX-GW-Neo, gerando o vetor pTREX-EGFP GW-Neo. 20 μ g do vetor pTREX-EGFP GW-Neo foram usados para transfectar 2.0×10^7 formas epimastigotas da cepa G usando o programa X-014 do nucleofector. 40 dias pós-transfecção (dpt) a cultura foi analisada por citometria de fluxo, usando o equipamento FACSCantoII. Para as análises, 20.000 eventos foram adquiridos e a porcentagem de células fluorescentes verdes foi registrado.

Para confirmar que as sequências espúrias que ficam no vetor após a reação de recombinação (sequências *attB*), não interferem de forma drástica na expressão gênica de cada ORF, a sequência codificadora da proteína fluorescente verde (GFP) foi transferida para o vetor de destino e a expressão de GFP avaliada após a seleção dos parasitos com G418. Como mostrado na figura 8B, foi detectado por citometria de fluxo a expressão em altos níveis e de forma homogênea da proteína fluorescente. É pertinente esclarecer que cada ORF particular poderá sofrer regulação diferenciada, o que não garante níveis iguais de expressão para cada ORF particular, mas as sequências reguladoras no vetor minimizarão essas variações.

EM UMA TRANSFEÇÃO QUANTOS PLASMÍDIOS SÃO INTEGRADOS POR CÉLULA?

O vetor pTREX usado neste trabalho foi um vetor que evoluiu a partir dos vetores pTEX e pRIBOTEX, com sequências reguladoras que garantem maior expressão de genes exógenos em *T. cruzi*, transcritos a partir do promotor de RNA ribossômico. No entanto, pouco é conhecido sobre quantas cópias do vetor podem ser integradas e mantidas por parasita após transfecção e seleção de parasitas recombinantes. Esta determinação é muito importante pois em transfecções contendo múltiplos vetores na abordagem em larga escala poderemos ter uma taxa de falsos negativos atribuído a este tipo de fenômeno. Para responder essa pergunta, foram gerados dois vetores pTREX um carregando GFP e outro RFP, que foram co-transfectados em quantidades equimolares (total de 20 µg de DNA plasmidial) em formas epimastigotas da cepa G de *T. cruzi*. Após seleção com G418 analisamos as populações recombinantes por microscopia confocal. Como se mostra na figura 9, a frequência de parasitas expressando um gene repórter foi significativamente maior que aquelas parasitas co-expressando os dois genes fluorescentes. Ou seja, o mais comum é manter um tipo de plasmídeo por célula.

CONSTRUÇÃO DO ORFoma NO VETOR DESTINO (PTREX-GW-NEO)

As 3380 ORFs clonadas em vetor de entrada (pENTR) foram subdivididas em 8 pools, sendo que cada pool está representado por aproximadamente 500 ORFs, a fim de manter ORFs de tamanho similar no mesmo pool e reduzir tendência de clonagem para fragmentos menores. Sendo assim os pools 1, 2, 3, 4, 5 e 6 contem representantes de 500 ORFs cada um, e os pools 7 e 8, que continham as ORFs de maior tamanho, contem representantes de 190 ORFs cada um deles.

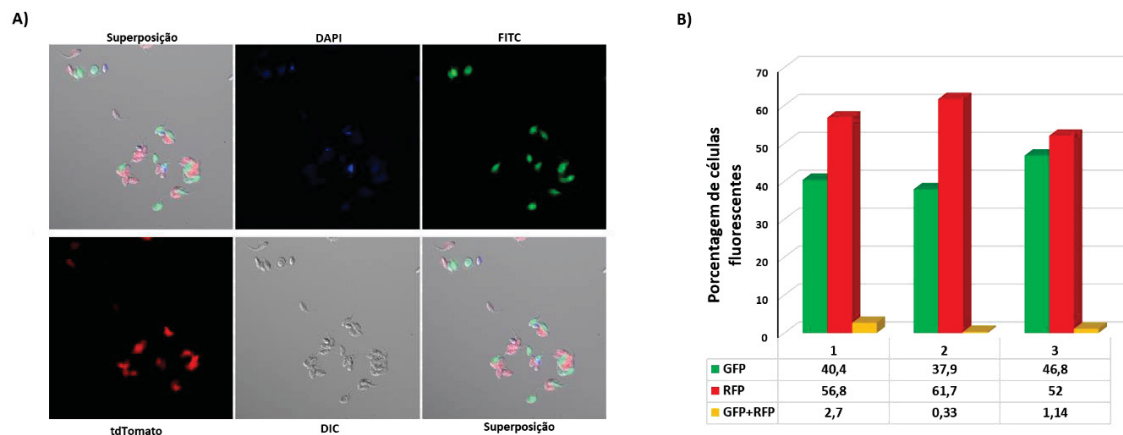


Figura 9. Avaliação da frequência de integração do vetor pTREX. A) Formas epimastigotas da cepa G de *T. cruzi* foram eletroporadas com 20 μg de uma mistura equimolar de plasmídeos expressando GFP e RFP, usando 10 μg de cada plasmídeo. Após seleção com G418, parasitas foram analisados por microscopia confocal. B) três transfecções independentes foram realizadas, e a frequência de parasitas expressando GFP, RFP ou ambas fluorescências foi estimada contando 300 células de cada transfecção independente.

Uma vez que o vetor pTREX-GW-Neo se mostrou funcional, os 8 pools de clones em pENTR foram transferidos para o vetor pTREX-GW-Neo, gerando 8 novos pools de clones no vetor destino. Os 8 pools produto da reação de recombinação LR foram utilizados para transformar células TOP10 eletrocompetentes. De cada uma das reações de transformação por pool foram recuperadas aproximadamente 6200 colônias, o que representa aproximadamente 15 vezes o ORFoma inicial. A fim de confirmar a qualidade desses 8 pools no vetor destino, 30 clones de cada pool tiveram o tamanho esperado dos insertos, o qual foi determinado seguindo-se o protocolo de lise alcalina, PCR utilizando primers que anelam nos sítios attB do pTREX-GW-Neo e eletroforese em gel de agarose (Figura 10).

A partir dos 8 pools de ORFs em pTREX-GW-Neo foram realizadas 8 maxipreparações de DNA. Para simplificar a etapa de transfecção essas 8 maxipreparações foram agrupados em 4 pools de plasmídeos que foram usados para transfectar de forma independente formas epimastigotas de *T. cruzi*. Paralelamente, foi realizada uma maxipreparação a partir dos 8 pools de bactérias, gerando uma população de plasmídeos que nós nomeamos como P.C. (ver materiais e métodos) (Figura 11A).

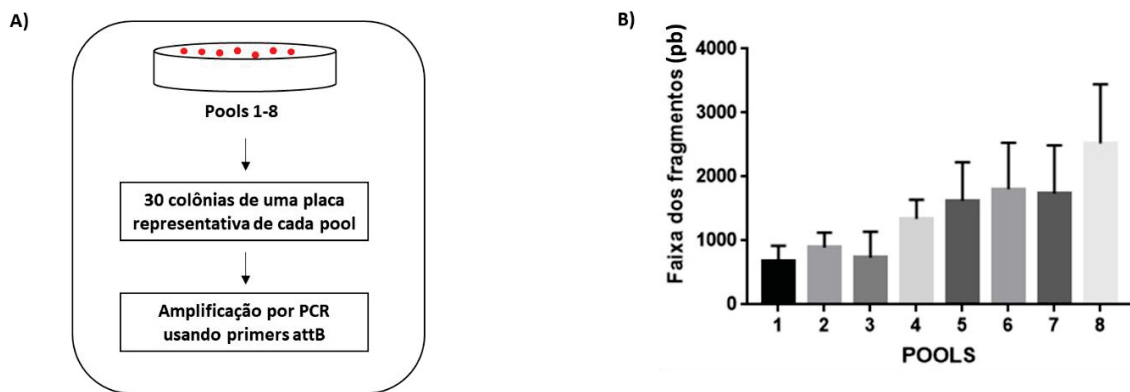


Figura 10. Confirmação do tamanho dos fragmentos clonados em cada pool de plasmídeos. A) Após transferência por recombinação LR das ORFs e transformação por eletroporação em *E. coli*, foram escolhidas 30 colônias aleatoriamente de cada um dos 8 pools individuais. Essas colônias foram amplificadas por PCR com primers que anelam em ambos extremos do sítio de clonagem, como se mostra no painel B, os tamanhos corresponderam ao perfil esperado para cada pool.

Tanto os 4 pools de plasmídeos quanto o pool P.C. foram transfectados de forma independente em 2.0×10^7 formas epimastigotas da cepa G de *T. cruzi* em fase de crescimento exponencial. Para aumentar a chance de ter uma melhor representatividade de clones nas populações recombinantes, cada pool foi transfectado 4 vezes, ou seja, geramos no final 20 populações carregando o ORFoma: 16 populações que vieram da transfecção dos 4 pools independentes e 4 populações de parasitas que vieram da transfecção do pool P.C.

Após transfecção e seleção, nós fizemos uma redução normalizada das 16 culturas provenientes da transfecção dos 4 pools para gerar uma única população de parasitas que nomeamos como P.C.1. Do mesmo modo, reduzimos as 4 populações de parasitas que vieram do pool P.C. que foi nomeada como P.C.2. (Ver materiais e métodos). Como se descreverá posteriormente, as populações P.C.1 e P.C.2 foram usadas para estudos funcionais.

A figura 11B mostra o perfil de amplificação da biblioteca antes (pDNA) e depois (gDNA) de serem eletroporados em *T. cruzi*. As populações P1A, P2A, P3A e P4A representam as 4 populações de parasitas independentes antes de serem agrupadas, quanto que as P.C.1 e P.C.2 mostram o perfil de amplificação já depois da combinação.

Como é mostrado na figura 11B, uma redução aparente na representatividade de clones nas populações independentes aconteceu após o processo de seleção com G418 nos parasitas (comparar pDNA vs gDNA). Também ocorreu alteração na representatividade nas populações combinadas P.C.1 e P.C.2 (canaletas 5 e 6).

Para ter uma melhor estimativa da representatividade de clones nas populações recombinantes carregando o ORFoma (P.C.1 e P.C.2), reduzindo os efeitos de *bias* da PCR decidimos fazer clonagem por diluição limitante da P.C.1, e analisar clones individuais por PCR. Como se mostra na figura 12A, uma relativa variabilidade foi observada na população,

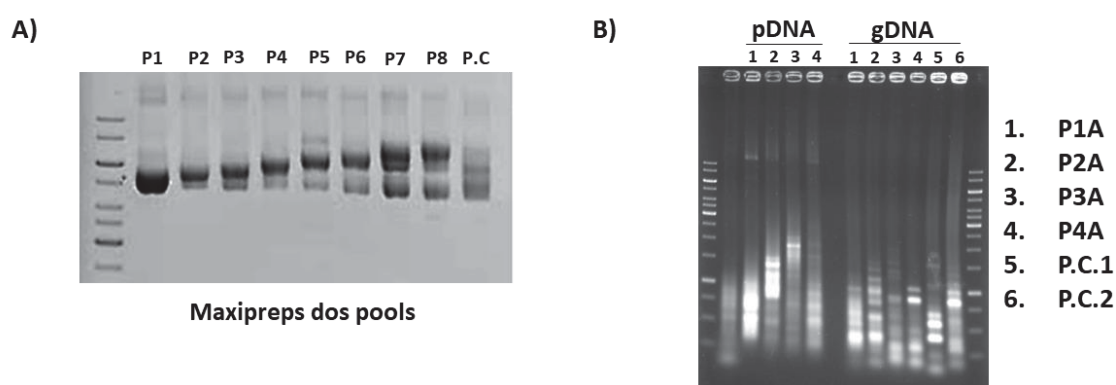


Figura 11. Genotipagem por PCR para estimar abundancia de clones nas populações carregando o ORFoma. A) Maxipreparações de DNA foram feitas a partir de cada um dos estoques de glicerol correspondente a cada pool, incluindo a P.C.2 (ver materiais e métodos). B) Para estimar a abundância relativa de clones em cada pool de plasmídeos antes da transfecção (pDNA) e depois de selecionar as populações de parasitas carregando o ORFoma (gDNA) foi feita uma reação de PCR usando primers que anelam a lado e lado do sitio de clonagem. P1A-P4A faz referencia às populações transfectadas como os 4 pools de plasmídeos de forma independente.

com fragmentos amplificados na faixa entre 250 e 1500 pares de bases num padrão diferente do obtido na canaleta 5 da figura 11B.

Em alguns casos mais de uma banda foi amplificada, sugerindo duas possibilidades: 1) o processo de clonagem não aconteceu de forma adequada, ou 2), diferente do observado para os plasmídeos contendo genes repórteres (Figura 9), mais de um plasmídeo está sendo mantido por célula. Para responder essa pergunta, foi realizada uma etapa de reclonagem de um dos clones aleatórios que houvessem amplificado duas bandas (Figura 12B). Os clones 1

e 9 foram selecionados para uma nova clonagem por diluição limitante, e analisamos por PCR os clones obtidos. Em cada caso, só foram obtidos subclones carregando uma das bandas visualizadas na etapa anterior, indicando que provavelmente ocorreu um problema na clonagem inicial.

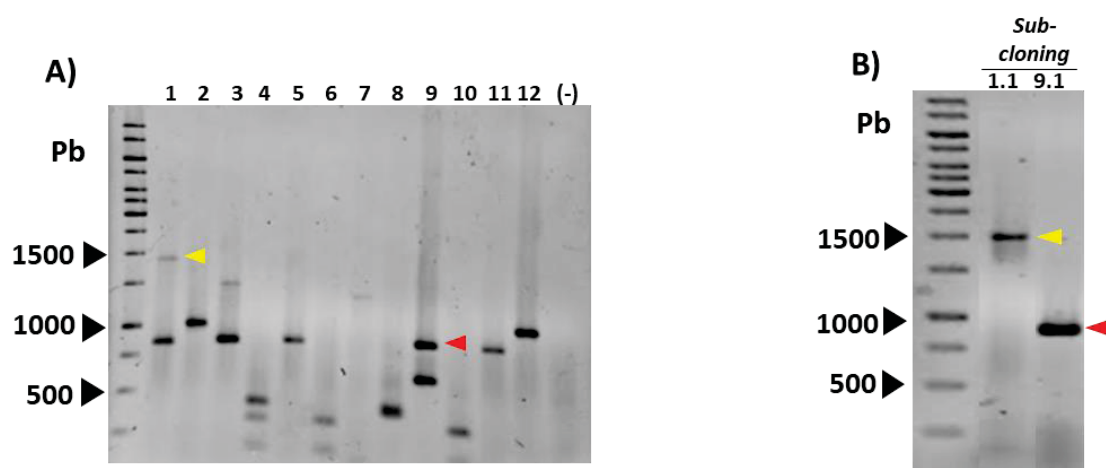


Figura 12. Clonagem de parasitas individuais por diluição limitante. **A)** 12 μ L de uma cultura 1.0×10^3 parasitas foram adicionados em 24 ml de meio LIT suplementado com soro e antibióticos. Esse volume foi dispensado em uma placa de 24 poços, adicionando 1 ml por poço e incubando a 28°C até obter poços com crescimento, um processo que levou perto de 45 dias. DNA genômico dos clones individuais foi usado para genotipagem por PCR, usando primers que anelam nos sítios attB. **B)** O clone 1 e o clone 9 foram submetidos ao mesmo processo de clonagem e genotipagem descrito em A, com a finalidade de resolver o perfil de bandas multiples (seta amarela e vermelha). (-): DNA genômico da cepa parental WT.

PROTOCOLO DE SELEÇÃO DE PARASITAS RESISTENTES A BENZONIDAZOLE.

A pesar da aparente baixa representatividade das populações carregando o ORFoma, decidimos submeter essas populações a um protocolo de indução de resistência a Benzonidazol (BZ), usando um protocolo previamente descrito (NIRDÉ; LARROQUE; BARNABÉ, 1995) (Figura 13), com o intuito de validar experimentalmente em larga escala a biblioteca de superexpressão de ORFs. A decisão de usar a BZ para testar a população recombinante esteve baseada no fato que o ORFoma parcial possui várias ORFs previamente associadas a resistência a BZ pelo aumento na expressão (Tabela 2). Sendo assim, as

populações P.C.1 e P.C.2 foram submetidas ao tratamento com benzonidazol por 15 semanas, sendo retiradas amostras de culturas em tempos intermediários do protocolo. A figura 14 mostra a genotipagem feita nas populações submetidas a pressão com droga e os respectivos controles internos, sem droga.

Gene associado	Droga	Autor
cyclophilin A, putative (CYPA)	benzonidazol	(RÊGO et al., 2015)
ascorbate peroxidase, putative (APX)	benzonidazol	(NOGUEIRA, Fernanda Barbosa et al., 2012)
tryparedoxin peroxidase, putative	benzonidazol	(NOGUEIRA, Fernanda B. et al., 2009)
prostaglandin F2alpha synthase (TcPGFS)	benzonidazol	(MEJIA et al., 2012)
NADP-dependent alcohol hydrogenase, putative	benzonidazol	(CAMPOS, F. M. F. et al., 2009)
tyrosine aminotransferase, putative	benzonidazol	(REGO et al., 2008)
iron superoxide dismutase, putative	benzonidazol	(MURTA, S. M. F. et al., 2008)
calpain-like cysteine peptidase, putative	benzonidazol	(ANDRADE et al., 2008)
glutamate dehydrogenase, putative	benzonidazol	(ANDRADE et al., 2008)
nucleoside diphosphate kinase (NDPK2)	benzonidazol	(ANDRADE et al., 2008)
Peroxidoxin	benzonidazol	(ANDRADE et al., 2008)
DNA repair protein RAD51, putative (RAD51)	benzonidazol	(RAJÃO et al., 2014)
Aldo-Keto Reductase (AKR)	benzonidazol	(GONZÁLEZ et al., 2017)
alcohol dehydrogenase, putative	benzonidazol	(GONZÁLEZ et al., 2017)

Tabela 2. Genes associados a resistência a benzonidazol em populações de *T. cruzi* com resistência natural ou induzida. Os genes na tabela foram identificados com expressão aumentada em cepas de *T. cruzi* com resistência natural ou induzida à droga, e estão presentes no ORFoma validado usado neste trabalho.

Como pode ser observado na figura 14, algumas bandas foram detectadas de forma diferencial nas populações tratadas com BZ. Esses produtos de PCR possuem os sítios attB que permitem reclonagem Gateway e transferidas para o vetor pDONR (Figura 7). Os clones obtidos a partir das 3 bandas em pDONR foram sequenciados, permitindo identificar que duas dessas ORFs correspondem a genes hipotéticos, e a 3ª ORF (seta amarela) corresponde ao ortólogo do gene TcCLB.504431.90 que codifica a ribonucleoproteína nuclear pequena U2.

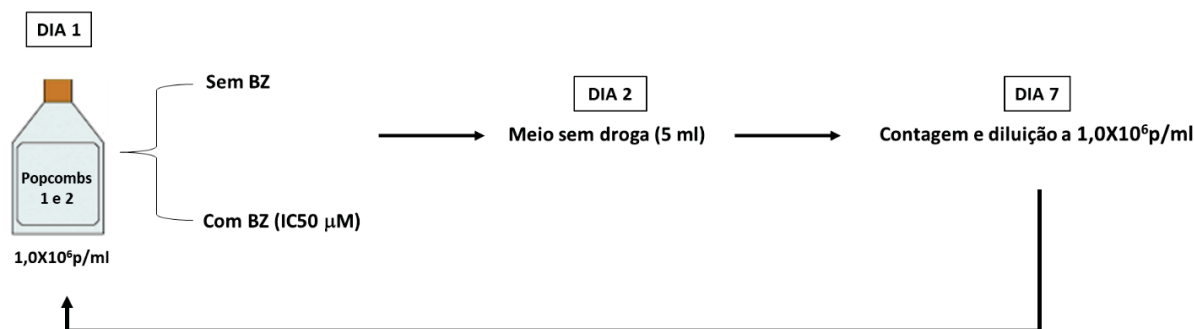


Figura 13. Esquema geral do protocolo de seleção de parasitos com resistência induzida a BZ nas (P.C.1. e P.C.2: Pop.Combs. 1 e 2). 1.0×10^7 p/ml em 5 ml de meio LIT completo foram incubados com $30 \mu\text{M}$ de BZ. Para cada Pop.Comb. um controle sem droga foi incluído e mantido durante todo o experimento. 24 horas depois as culturas (tratamento e controles) foram centrifugados e o sobrenadante descartado. 5 ml de meio sem drogas foram adicionados a cada tubo (tratamento e controles) e incubados a 28°C por 7 dias. Ao sétimo dia as culturas foram contadas e diluídas novamente a 1.0×10^7 p/ml em 5 ml de meio LIT completo, e incubadas com ou sem droga. O protocolo foi repetido por 10 semanas mantendo a concentração do BZ nas culturas “tratamento”. A partir da semana 11 e até a semana 15 a concentração foi aumentada em doses de $10 \mu\text{M}$ por semana, finalizando na semana 15 com $80 \mu\text{M}$ de BZ. Protocolo adaptado de Nirdé et al (NIRDÉ; LARROQUE; BARNABÉ, 1995).

VALIDAÇÃO DAS ORFs IDENTIFICADAS NAS POPULAÇÕES TRATADAS COM BZ.

Os 3 genes clonados em pDONR foram transferidos para o vetor pTREX-GW-Neo e re-transfectados de forma individual em epimastigotas da cepa G selvagem e selecionadas com G418. As populações recombinantes foram submetidas ao teste de resistência a BZ. Como pode ser observado na figura 15, as duas proteínas hipotéticas (clone 1 e 3) não mostraram diferenças significativas em relação ao controle (vetor vazio), sugerindo que tais ORFs sejam falsos positivos. Porém, a ribonucleoproteína nuclear pequena U2 (clone 2) mostrou níveis de sobrevivência significativamente maiores que o controle carregando o vetor vazio e a cepa G selvagem em concentrações elevadas de BZ, indicando uma provável contribuição dessa ribonucleoproteína no mecanismo de resistência.

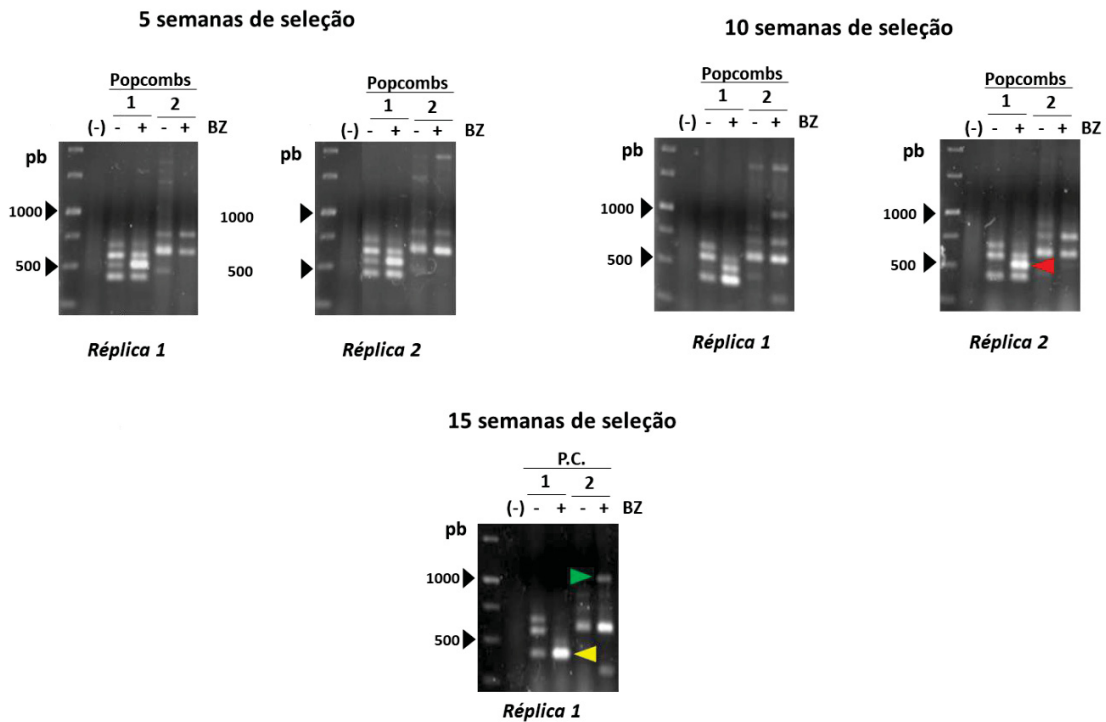


Figura 14. Genotipagem das populações submetidas ao protocolo de seleção com benzonidazol. As populações P.C.1 e P.C.2 submetidas a seleção com benzonidazol (+) e o respectivo controle sem droga (-) foram analisadas por PCR, usando primers que anelam no sítio attB do vetor. Como controle negativo de amplificação foi usado DNA genômico da cepa G parental, selvagem. As genotipagens foram feitas 5, 10 e 15 semanas após o início do protocolo de seleção. As setas identificam as ORFs que apareceram com um perfil de amplificação diferencial entre as populações tratadas (+) e não tratadas (-), e que foram selecionadas para validação individual.

A análise da estrutura primária da RNP-U2 revelou a presença de um motivo de reconhecimento a RNA (RRM), como esperado. Trabalhos posteriores são necessários para caracterizar em detalhe o papel dessa ribonucleoproteína no contexto da resistência a BZ.

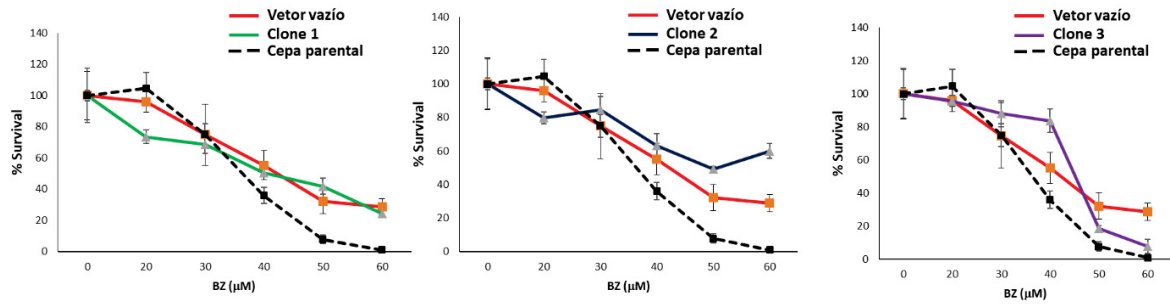


Figura 15. A RNP-U2 está associada a resistência a benznidazol. Formas epimastigotas da cepa G de *T. cruzi* foram transfectadas de forma individual com as ORFs clonadas em pTREX-GW e selecionadas com G418. Um controle vazio foi incluído, contendo todas as características do vetor parental e um sítio de clonagem múltiplo em lugar das ORFs. 5.0×10^6 parasitas das populações recombinantes e da cepa parental WT foram tratadas com concentrações crescentes de benznidazol por 72 horas. O número de parasitas viáveis foi estimado por contagem em câmara de Neubauer. As barras indicam o desvio padrão de 3 experimentos independentes com 3 réplicas técnicas cada um.

DISCUSSÃO

O nosso primeiro objetivo foi melhorar as condições de eletroporação em formas epimastigotas de *T. cruzi*, com a finalidade de incrementar a representatividade de clones na população após transfecção do ORFoma. Como descrito no Capítulo I desse documento, as eficiências de eletroporação foram consideravelmente otimizadas, conseguindo atingir eficiências de até 35% quando avaliado por expressão de GFP. Estes valores são ~3 vezes superiores aos reportados previamente (DAROCHA; SILVA et al., 2004;OLMO et al., 2018;XU et al., 2009). Uma discussão mais extensa encontra-se descrita no Capítulo I.

Neste trabalho reportamos o desenho e construção de bibliotecas de superexpressão de ORFs para futuros análises em larga escala em *T. cruzi*. É, a nosso conhecimento, a primeira tentativa genômica funcional em escala focada no descobrimento de genes associados a resistência a benzonidazol em *T. cruzi*, usando bibliotecas de superexpressão. Esse tipo de abordagens já foi implementado em *Leishmania spp.* e *T. brucei*, com resultados bem interessantes que permitiram identificar genes associados a fenótipos de resistência a drogas (BEGOLO; ERBEN; CLAYTON, 2014;COTRIM; GARRITY; BEVERLEY, 1999). Nessas abordagens segmentos genômicos aleatórios foram clonados em vetores otimizados para superexpressão com sequências reguladoras previamente caracterizadas, permitindo a expressão induzível desses segmentos por tetraciclina (BEGOLO; ERBEN; CLAYTON, 2014). Neste trabalho, construímos uma variante do vetor pTREX adaptado para clonagem Gateway, com as características próprias do pTREX que tem mostrado eficiente expressão de genes ectópicos em formas epimastigotas do parasita *T. cruzi*. Como foi mostrado na figura 8B, o vetor pTREX-GW-Neo mostrou níveis elevados e homogêneos de expressão do gene repórter EGFP, resultado que sugere que as sequências dos sítios de recombinação *attB*, localizados a montante do início de tradução das ORFs e a jusante do códon de parada, não interferem de forma significativa na expressão dos genes clonados no vetor, um resultado esperado baseado em resultados prévios (BATISTA, M. et al., 2010;KUGERATSKI et al., 2015).

Trabalhos publicados previamente mostraram que o vetor pTREX é um vetor que integra no locus de RNA ribossômico do parasita *T. cruzi*, inclusive quando ele é transfectado de forma circular (LORENZI; VAZQUEZ; LEVIN, 2003). Contudo, não é claro quantas

cópias do vetor podem ser mantidas por parasita, ou seja, quantos eventos de recombinação podem acontecer por célula, um dado que para o nosso objetivo é de extrema relevância. Decidimos responder essa pergunta co-transfectando formas epimastigotas do parasita com plasmídeos expressando GFP e RFP, com resistência a G418 em ambos plasmídeos. A figura 9 mostra que parasitas co-transfectados expressaram preferencialmente um dos dois genes repórter, sugerindo que um único evento de integração aconteceu por célula. Apesar de existir a possibilidade de que esses plasmídeos sejam mantidos na forma episomal, essa chance é menos provável. Lorenzi et. al. demonstraram que o pTREX integra rapidamente, dentro das primeiras 5 horas pós-transfecção, e que os plasmídeos que não integraram são rapidamente degradados (LORENZI; VAZQUEZ; LEVIN, 2003). Esses resultados mostram que a frequência de recombinação pode ser muito baixa, apesar de existir diferentes *locus* de RNA ribossômico no genoma do *T. cruzi*.

Quando nós analisamos as populações transfectadas com a biblioteca de plasmídeos representando o ORFoma total por meio da genotipagem por PCR, notamos que houve uma redução aparente na representatividade de clones na população (Figura 11B, pDNA vs gDNA). Esse resultado sugere algumas das seguintes possibilidades: 1) apesar de usarmos o protocolo otimizado detalhado no Capítulo I, a eletroporação foi eficiente, mas a recombinação não é e precisa ser melhorada, e 2) algum tipo de seleção acontece no parasita sob pressão com G418, onde algumas ORFs favorecem um melhor *fitness* prevalecendo na população. Somado ao fato que algumas ORFs em superexpressão possam ser direta e/ou indiretamente tóxicas ao parasita. Esse é um viés inerente a abordagem com expressão não regulada.

Contudo, e a pesar da aparente baixa representatividade de clones na população transfectada, decidimos testar funcionalmente essa população carregando o ORFoma parcial usando um protocolo de indução de resistência a benzonidazol previamente reportado (NIRDÉ; LARROQUE; BARNABÉ, 1995). Esse protocolo mostrou ser eficiente para induzir resistências em populações selvagens, incrementando as dosagens da droga de forma gradual em um período de 15 semanas, finalizando com dosagens quase três vezes acima da IC50 estimada experimentalmente. Provavelmente, este protocolo de seleção deva ser

alterado, utilizando doses superiores a IC50 desde o início do processo para reduzir os efeitos de seleção de resistentes naturais (origem genômica) sendo o fenótipo atribuído ao transgene.

Mesmo com os problemas mencionados de baixa representatividade e ao protocolo de seleção aplicado, nós observamos diferenças no perfil de amplificação entre as populações submetidas a pressão com a droga e os respectivos controles sem droga (figura 14). Algumas das bandas que mostraram um perfil diferente de amplificação nas duas réplicas biológicas foram purificadas em gel de agarose, sequenciadas e validadas experimentalmente de forma isolada quanto a sua capacidade de causar resistência a BZ. Nós observamos que uma dessas ORFs, a RNP-U2 (TcCLB.504431.90), conferiu resistência significativa na população transfectada, relativo aos controles parentais (selvagem) e um controle transfectado com um vetor vazio (Figura 15).

A RNP-U2 tem um motivo de reconhecimento a RNA (RRM), uma plataforma plástica de ligação de RNA para regulação da expressão gênica pós-transcricional (MARIS; DOMINGUEZ; ALLAIN, 2005). Em eucariotos, o motivo RRM é um dos domínios proteicos mais abundantes. Até a data presente, mais de 51000 sequências com a arquitetura RRM tem sido identificadas em mais de 3300 espécies (<https://pfam.xfam.org/family/PF00076>). Em *T. cruzi*, esses domínios RRM estão presentes em mais de 80 proteínas, destacando-se as proteínas ricas em uridina TcUBP-1 e TcUBP-2, as quais tem sido extensivamente estudadas tanto a nível estrutural como ao nível da sua função biológica (D'ORSO; FRASCH, 2001). Experimentalmente, foi demonstrado que tanto TcUBP-1 como TcUBP-2 reconhecem sequências no extremo 3'UTR de RNAs, em motivos nomeados ARES (*AU-rich elements*), induzindo a sua rápida degradação (D'ORSO; FRASCH, 2001; 2002). Por uma abordagem proteômica, Alves *et. al.* identificaram ao antígeno intracelular de células T-1 (TIA-1), associado a repressão da tradução em resposta a estresse em formas epimastigotas de *T. cruzi*. TIA-1 apresenta 3 motivos RRM no domínio N-ter, e foi demonstrado que essa proteína reprime a tradução dos RNAs mensageiros do TNF- α e da ciclooxigenase-2 (FÖRCH; VALCÁRCEL, 2001). Outras proteínas com motivos RRM em *T. cruzi* têm sido caracterizadas funcionalmente, com funções associadas a diferenciação (PÉREZ-DÍAZ *et al.*, 2012; 2013), regulação por *splicing* (DE GAUDENZI; FRASCH; CLAYTON, 2005) e na tradução (BATISTA, J. A. *et al.*, 1994). Diferentemente

dessas *RNA binding proteins*, a proteína ligadora de pequeno RNA nuclear U2 forma o complexo U2 snRNP que faz parte do spliceossomo em eucariotos (WILL; LUHRMANN, 2011) o que dificulta ver uma conexão direta dessa função com a resistência à droga testada.

Como já foi mencionado em diferentes partes do texto, e como é mostrado na figura 11B, a representatividade de nossa biblioteca de superexpressão de ORFs foi relativamente baixa. Trabalhos futuros deverão contemplar a possibilidade de aumentar a eficiência de integração de clones em *locus* genômico do parasita transcricionalmente ativos com a finalidade de melhorar essa representatividade de clones na população. Uma abordagem interessante seria induzir uma quebra ao nível do DNA em um sítio específico do genoma para melhorar a eficiência de integração e resolver efeitos de posição, como foi já mostrado por Glover *et al.* em *T. brucei* (GLOVER; HORN, 2009). Nesse trabalho, os autores integraram um sítio reconhecido pela meganuclease *Sce-I* em um locus que oferece expressão induzível de maneira uniforme, e expressaram a nuclease *Sce-I* sob controle do promotor de tetraciclina. Quando eles transfectaram um DNA plasmidial com sequências de homologia para recombinação em essa população de parasitas induzidos com tetraciclina, observaram eficiências de transformação pelo menos 300 vezes maior que a eletroporação do mesmo DNA em células não induzidas. Quebras no DNA podem agora ser induzidas com maior facilidade usando o sistema CRISPR-Cas9, que tem mostrado uma boa eficiência em *T. cruzi* (LANDER *et al.*, 2015b; PENG *et al.*, 2015b; SOARES MEDEIROS *et al.*, 2017). O sistema CRISPR-Cas9 permitiu alvejar tanto genes de cópia única quanto genes multicópia, demonstrando o enorme potencial dessa metodologia para editar o genoma do *T. cruzi* (PENG *et al.*, 2015b).

Outra forma de favorecer o incremento na variabilidade é utilizar mecanismos para controle da expressão gênica por meio de recombinações sítio-específicas no DNA, usando sistemas tipo CRE-*loxP*; esse sistema pode ser empregado também para inserção de sequências. CRE é uma recombinase de DNA de bacteriófagos que reconhece uma sequência de 34 pares de bases chamada de *loxP*, que dependendo da orientação e localização pode resultar em recombinação inter ou intramolecular entre dois sítios *loxP* (GHOSH; VAN DUYNE, 2002). CRE recombinase tem sido usada para a integração sítio-específica em diferentes modelos eucarióticos (BETHKE; SAUER, 1997; LANZA; DYESS; ALPER,

2012;OSTERWALDER et al., 2010). Já para controle da expressão (*Knock out* condicionais) foi aplicado com sucesso em *Leishmania* sp. (DAMASCENO et al., 2018;DUNCAN et al., 2016;SANTOS et al., 2017), e de forma mais restrita na remoção de marcas de resistência em *T. cruzi* (KANGUSSU-MARCOLINO et al., 2014). A otimização desse sistema permitirá uma melhor performance desse sistema de bibliotecas genômicas funcionais. Nesse sentido, no capítulo seguinte desse documento descreveremos os notáveis avanços na recombinação mediada pela proteína CRE em *T. cruzi*.

A decisão de utilizar o sistema CRISPR-Cas9 ou o sistema CRE-*loxP* para manipulação genômica dependerá de vários fatores, incluindo a pergunta biológica particular. Mas claramente, os dois sistemas podem ser usados em combinação como ferramentas funcionais para diferentes abordagens, como já foi mostrado recentemente (NOIMAN; KAHANA, 2018;YANG et al., 2017). Ambos os sistemas ainda precisam de muita adaptação para serem utilizados com facilidade em tripanossomatídeos.

Apesar das ressalvas quanto a variabilidade, o sistema de genômica funcional em larga escala desenhado aqui, utilizando o sistema Gateway® e o banco de ORFs do Dr Probst, nos permitiu visualizar os pontos fracos, mas mais importante permitiu uma manipulação de sequências (clonagem e recuperação de fragmentos) e modificação do parasita para validação bastante prática e rápida. A otimização desse sistema, poderá permitir responder várias perguntas biológicas deste organismo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cepas e culturas de *T. cruzi*.

Cultivos axênicos de formas epimastigotas da cepa G de *T. cruzi* foram mantidos a 28°C em meio LIT (*liver infusion tryptose*) suplementado com 10% soro fetal bovino, estreptomicina sulfato (0.2 g/l) e penicilina (200,000 U/l). Epimastigotas em fase de crescimento exponencial foram usados em todos os experimentos.

Construção do vetor de destino baseado em pTREX para clonagem Gateway®, e do vetor pTREX-EGFP-GW.

O vetor pTREX-GFP_Neo foi digerido com o intuito de retirar a sequência codificadora da GFP. O vetor linearizado foi utilizado para a clonagem de um sítio de clonagem múltipla (MCS) gerado por anelamento dos seguintes oligonucleotídeos sintéticos complementários: MCS_Gateway-FOR (TCGACAGATCTCCCGGGACTAGTGGATCCC) e MCS_Gateway-REV (TCGAGGGATCCACTAGTCCCGGGAGATCTG). O anelamento foi feito usando 10 µL de cada oligonucleotídeo (100 µM cada) em tampão Tango 1X (33 mM Tris-acetato (pH 7.9 a 37°C), 10 mM acetato de magnésio, 66 mM acetato de potássio, 0.1 mg/ml BSA). A reação foi incubada a 95°C por 5 minutos seguido por incubação a temperatura ambiente por 1 hora. Esses óligos em dupla fita geram extremidades compatíveis com os sítios do vetor linearizado, que após ligação geraram o vetor pTREX-MCS-Neo. O cassette ccdB-cloranfenicol flanqueado por sítios de recombinação LR foi obtido por digestão com as enzimas de restrição BglIII e XhoI usando como molde o vetor pDEST15 (ThermoFisher). O cassette foi purificado do gel e clonado no vetor pTREX-MCS-Neo previamente digerido com BglIII e XhoI. A reação da ligação foi transformada em células com fenótipo ccdB resistente. Alguns dos clones obtidos foram confirmados por digestão e PCR, conseguindo finalmente confirmar o vetor pTREX-MCS-GW_Neo, o vetor que foi usado para recepcionar o ORFoma clonado em pENTR.

O vetor pTREX-EGFP-GW foi obtido por recombinação LR usando como molde os vetores pTREX-MCS-GW_Neo e um vetor doador (pDONR) com a sequência da EGFP clonada, usando a enzima LR clonase. O produto da ligação foi transformado em células Top10 de *E. coli*, susceptíveis a ccdB para fácil triagem de clones positivos. O vetor pTREX-EGFP-GW confirmado foi eletroporado em formas epimastigotas de *T. cruzi* seguindo o protocolo de transfecção otimizado reportado no capítulo I.

Obtenção de células Top10 eletrocompetentes de alta eficiência e transformação da reação de recombinação.

Células Top10 eletrocompetentes foram obtidas usando um protocolo *in-house*. Em breve, 5 colônias isoladas de células Top10 foram inoculadas *overnight* em 5 ml de meio LB (Luria Bertani) em um shaker orbital com temperatura de 37°C e 120 r.p.m. Desse pre-inóculo foram tomados 2 ml e adicionados em 198 ml de meio LB *low salt* (10 vezes menos NaCl que o

usado para preparar o meio LB convencional). A cultura foi incubada novamente a 37°C a uma rotação de 120 r.p.m, até atingir uma densidade ótica (D.O) de 0.4. Nessa D.O a cultura foi rapidamente transferida a uma caixa com abundante gelo e mantida nessa condição por 30 minutos. Após 30 minutos, o volume total foi transferido a tubos cónicos de 50 ml (pre-esfriados) e centrifugados a 4000 r.p.m por 10 minutos, a 4°C. O pellet de cada tubo foi recuperado em um único tubo cónico de 50 mL e as células foram ressuscitadas em 30 mL de água MQ gelada. As células foram centrifugadas novamente a 4000 r.p.m a 4°C por 10 minutos. O protocolo de lavagem com água MQ gelada foi repetido por 2 vezes adicionais. Finalmente, após a terceira e última lavagem, as células foram ressuscitadas em 4 mL de glicerol 15%, alíquotadas em volumes de 100 µL e armazenadas a -80°C. Uma alíquota foi usada para transformar imediatamente com o vetor pBlueScript para estimar a eficiência das células eletrocompetentes, obtendo valores de eficiência que oscilaram entre $1-3 \times 10^9$ u.f.c por micrograma de DNA.

Transferência do ORFoma desde o vetor doador (pDONR) para o vetor pTREX-MCS-GW usando a estratégia de clonagem Gateway®.

35 pools de plasmídeos foram doados pelo pesquisador Christian Macagnan Probst (Fiocruz, Paraná), correspondente à parte do ORFoma previamente validado (estratégia em processo de publicação). Esses 35 pools de plasmídeos em pENTR foram consolidados em 8 pools finais, por meio de uma mistura artificial dos pools originais usando como critério o tamanho das ORFs representativas de cada pool. Esses 8 pools de plasmídeos foram transferidos para o vetor pTREX-MCS-GW usando recombinação LR (ThermoFisher) de acordo as recomendações do fabricante. Em breve, em um tubo de microcentrifuga foram adicionados 100 ng de cada pool de plasmídeos, 100 ng do vetor de destino (pTREX-MCS-GW), tampão TE (pH 8.0) até 8 µL, 2 µL da LR clonase II e a reação foi incubada a 25°C por 1 hora. A mistura da reação de recombinação (2 µL) foi transformada em 100 µL de células Top10 eletrocompetentes ccdB sensíveis. A mistura DNA-células foi rapidamente transferida a cubetas de eletroporação de 2 mm, pre-geladas, e eletroporados com um único pulso no equipamento GenePulser da Biorad, com a seguinte configuração: 25 µF, 200 ohms, 2.5 kV. As células foram rapidamente transferidas a um tubo eppendorf de 1.5 ml, recuperadas em

800 μL de meio SOC e incubação por 1 hora a $37^\circ\text{C}/120$ r.p.m. 200 μL da mistura de transformação foram plaqueados em LB ágar contendo 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ampicilina para seleção e incubadas em uma estufa a 37°C *overnight*.

PCR de colônia.

Colônias bacterianas que cresceram em cada uma das placas representativa da transformação com a reação de recombinação de cada pool independente foram ressuspendidas em 10 μL de água MQ estéril. 1 μL foi utilizado para a reação de PCR em meio reacional contendo 1 μL do tampão de PCR 10X, 4 mM de cloreto de magnésio, 200 μM dNTPs e 1 μM de cada iniciador (**attB1_For:** GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCACCATG e **attB2_Rev-STOP:** GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGATTCA). As condições de PCR foram como segue: desnaturação a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos/ 62°C por 30 segundos/ 72°C por tempo variável (dependendo do pool sendo analisado) e extensão final a 72°C por 10 min.

Protocolo de recuperação de colônias das placas transformadas com os 8 pools independentes de plasmídeos.

De cada transformação correspondente aos 8 pools de plasmídeos foram recuperadas ~6200 colônias. Em breve, as colônias obtidas em cada placa de petri foi estimada, e recuperadas adicionando 2 ml de meio LB na superfície da placa. O meio LB foi homogeneizado por meio de movimentos circulares para remover o maior número de colônias de cada placa, que foram logo recuperadas em tubos cônicos de 15 ml e centrifugadas a 4000 r.p.m por 5 minutos a 4°C . O pellet foi gentilmente ressuspendido em 5 ml de meio LB e posteriormente foram adicionados 5 mL de glicerol 50%. Os tubos foram rapidamente transferidos a -80°C . Em total, nós recuperamos ~50.000 clones de bactérias, que representam o ORFoma total clonado no vetor de expressão baseado em pTREX. Esse número de clones representa uma cobertura de ~15 vezes o ORFoma.

Maxipreparações do DNA plasmidial.

A partir dos estoques de glicerol correspondentes a cada pool foram feitas extracções de DNA plasmidial. Em breve, 20 µL de cada estoque de glicerol foram adicionados em 10 mL de meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina (pre-inóculo) e incubados *overnight* a 37°C em um shaker orbital a 120 r.p.m. 2 mL desse pre-inóculo foram usados para inocular 200 mL de meio LB que foi incubado *overnight* nas mesmas condições de temperatura e rotação que acima descrito. As culturas foram processadas seguindo as recomendações do *kit* comercial *PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit* (Thermo Fisher Scientific). O DNA correspondente a cada pool foi quantificado em nanodrop e armazenado a -20°C até o seu uso. O rendimento das maxipreparações foi similar para todos os pools (3µg/µl). Para gerar a população P.C. foi feita uma mistura a partir dos 8 estoques de glicerol individuais, ou seja, 10 µL de cada estoque de glicerol foram adicionados em 10 mL de meio LB (80 µL em 10 mL de LB) e processados da mesma forma que foi descrito para os pools individuais. O pool P.C. foi usado diretamente para transfectar formas epimastigotas do parasita gerando a população recombinante P.C.2.

Transfecção de ADN plasmidial em formas epimastigotas de *T. cruzi*.

A cepa G de *T. cruzi* foi transfectada como é descrito no Capítulo I desse documento de tese. Em breve, $2,0 \times 10^7$ formas epimastigotas em fase de crescimento exponencial foram lavados com o tampão de eletroporação Tb-BSF 1X (5mM KCl, 0,15 mM CaCl₂, 90 mM Na₂HPO₄, 50 mM HEPES, pH 7.3) a temperatura ambiente. Os parasitas foram eletroporados em um equipamento nucleofector 2b (Amaxa), usando o programa X-014 que deu resultados mais consistentes na transfecção transiente (Capítulo I). 20 µg de ADN plasmidial foram utilizados em todas as transfecções do ORFoma. Depois da transfecção os parasitas foram transferidos para 5 mL de meio LIT completo e incubados a 28°C. Vinte quatro (24) horas pós-transfecção o antibiótico G418 (250 µg ml⁻¹) foi adicionado para selecionar os parasitas recombinantes. Sempre uma cultura *mock*-transfectada foi usada para acompanhar o tempo de seleção, que aconteceu logo de 21 dias. Em total, 20 culturas foram transfectadas (4 para cada pool, incluindo a P.C.2) e após seleção foram repicadas 3 vezes antes de submete-las ao protocolo

de seleção com BZ descrito posteriormente, mantendo sempre a droga G418 na concentração de 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$. As 20 culturas foram congeladas individualmente para manter os estoques de parasitas para usos futuros. As 4 culturas correspondentes a cada pool foram misturadas, gerando uma única população de parasitas carregando um pool de ORFs. A mistura foi feita normalizando por número de parasitas, ou seja, de cada uma das 4 culturas foram recuperadas 1.0×10^7 parasitas e adicionadas em 30 mL de meio LIT completo, gerando uma única população de parasitas a uma densidade de 1.3×10^6 parasitas/mL. No final, 5 populações foram obtidas (P1A, P2A, P3A, P4A e P.C.2). Para gerar a P.C.1 seguiu-se o mesmo processo descrito acima misturando as populações P1A, P2A, P3A e P4A. No final, P.C.1 e P.C.2 foram crescidas em 30 mL de meio LIT completo e usadas diretamente no protocolo de seleção de resistência a benzonidazol.

Protocolo de seleção de parasitas com resistência induzida a benzonidazol.

O protocolo que foi implementado foi reportado por Nirdé e colaboradores previamente (NIRDÉ; LARROQUE; BARNABÉ, 1995). Formas epimastigotas da cepa G carregando o ORFoma (P.C.1 e P.C.2) foram diluídas para 1.0×10^6 em um volume final de 5 mL de meio LIT completo. As culturas foram divididas em dois grupos: um grupo foi mantido sem droga (controles) e o outro grupo foi incubado com 30 μM de benzonidazol (testes). 24 horas após tratamento, todas as culturas (tanto controles quanto testes) foram centrifugadas a 5000xg por 5 minutos a temperatura ambiente para remover o médio com droga, e foram adicionados 5 mL de meio LIT sem droga a todas as culturas. As culturas foram mantidas a 28°C por 6 dias para permitir a recuperação dos parasitas que sobreviveram a ação da droga. No sétimo dia, as culturas foram novamente contadas e diluídas para 1.0×10^6 e tratadas como se descreveu acima. Esse protocolo foi repetido por 10 semanas, mantendo a concentração da droga nas culturas testes em 30 μM . A partir da semana 11 e até a semana 15 a concentração da droga foi incrementada em doses de 10 μM , finalizando na semana 15 em 80 μM . Em tempos intermediários do protocolo, nas semanas 5 e 10, e ao final da semana 15, 1.0×10^7 parasitas foram recuperados dos tubos controles e testes para genotipagem por PCR.

Extração de DNA genômico e genotipagem das culturas controle e testes das P.C.1 e P.C.2.

1.0×10^7 parasitas foram usados para a extração de ADN genômico usando um protocolo rápido de extração. Em breve, os parasitas foram centrifugados a $5000 \times g$ por 5 minutos e o pellet resultante foi ressuscitado em 100 μL do tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM) e 1% SDS. Os tubos foram incubados rapidamente a 60°C por 10 minutos e posteriormente foram adicionados 30 μL de acetato de sódio 3M, pH 5.2. Os tubos foram incubados em gelo por 5 minutos e centrifugados a $15,000 \times g$ por 1 minuto. 130 μL do sobrenadante foram recuperados e 2 volumes de etanol absoluto gelado foram adicionados. Os tubos foram incubados a -20°C por 30 minutos para precipitar o DNA genômico. Finalmente, cada tubo foi centrifugado a $15,000 \times g$ por 20 minutos e o pellet obtido foi lavado com 300 μL de etanol 70%. O pellet resultante foi ressuscitado em 30 μL de tampão TE e usado para genotipagem por PCR. 3 μL do DNA genômico foram incubados em um meio reacional contendo 0,1 U da enzima Taq DNA polimerase (ThermoScientific), 5 μL do tampão 10X fornecido pelo fabricante, 4 mM de cloreto de magnésio, 200 μM de dNTPs, e 4 μM dos iniciadores attB1_For e attB2_Rev-STOP. Os iniciadores flanqueiam o sítio de recombinação, permitindo amplificar as ORFs clonadas. O DNA genômico foi desnaturado por incubação a 94°C por 5 minutos. A amplificação foi realizada em um termociclador (eppendorf) em 30 ciclos de três temperaturas: 30 segundos de desnaturação a 94°C , 30 segundos para anelamento dos iniciadores attB a 62°C e 3 minutos de extensão a 72°C . Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

Clonagem e reclonagem da população P.C.1

A população P.C.1 foi diluída a 1.0×10^3 parasitas por mL, em um volume de 1 ml (relação 1 parasita por cada 1 μL). 12 μL dessa diluição foram adicionados em 24 mL de meio LIT completo, contendo 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ da droga G418. O meio com as parasitas foi homogeneizado e adicionado em placas de 24 poços em volume de 1 mL por poço. A finalidade do método é obter pelo menos a metade dos poços com crescimento de clones de parasitas, que foi evidenciado aproximadamente após 40 dias do cultivo inicial. Os clones obtidos foram

mantidos em volume de 3 mL até a extração de DNA genômico e amplificação por PCR como descrito acima. O protocolo para reclonagem dos clones 1 e 9 foi exatamente igual.

Clonagem dos genes para validação individual.

Para a validação individual, 3 genes que mostraram um perfil de amplificação diferenciado entre populações controles e testes foram purificados do gel. Em breve, cada banda foi cortada do gel e purificada usando o kit *GenElute Gel Extraction kit* (Sigma) de acordo as condições recomendadas pelo fabricante. O DNA eluido foi usado diretamente para clonagem BP no vetor pDONR221, tomando vantagem que a amplificação com os iniciadores *attB1_For* e *attB2_Rev-STOP* gera os sítios necessários e suficientes para clonagem direta no vetor pDONR. Alguns dos clones obtidos após transformação em *E. coli* foram amplificados por PCR para confirmar o fragmento clonado por estimativa de tamanho. Os clones confirmados (por tamanho) foram usados para clonagem LR no vetor de destino pTREX-MCS-GW. Dois clones correspondente a cada um dos 3 genes foram eletroporados na cepa G de *T. cruzi* usando o protocolo previamente descrito.

Análises por citometria de fluxo.

2.0×10^6 parasitas foram centrifugados a 5000xg por 5 minutos e resuspendidos em 500 μ L de PBS 1X, para serem posteriormente analisados por citometria de fluxo. As análises das populações de parasitas fluorescentes foram realizadas usando o citômetro FACS Canto (BD Bioscience) junto com o software FACS Diva para a aquisição dos dados (Plataforma de Citometria de Fluxo RPT08L/ Instituto Carlos Chagas - Fiocruz Paraná). Para cada amostra, 20.000 eventos das populações de interesses foram analisados. A análise dos dados obtidos utilizou o software FlowJo (TreeStar, USA).

Análises por microscopia confocal.

Slides foram examinadas usando um microscópio confocal laser A1RSiMP (Nikon, Tokyo, Japan). Células contendo multiplex parasitas foram submetidos a um processamento em 3 dimensões (*z-stacking*) para permitir um preciso análise das células em diferentes campos focais, usando os objetivos 20x ou 60x. O software *Imaging Software Nis Elements 4.20* (NIKON, Tokyo, Japan) foi usado para visualizar as imagens e produção de animações em 3D por meio das fatias em z (*z stacks*).

Capítulo III

CREditing: A powerful tool for gene tuning in *Trypanosoma cruzi*.

Manuscrito submetido

CREditing: A powerful tool for gene tuning in *Trypanosoma cruzi*

Lisandro Pacheco-Lugo^{1,2}, José Sáenz-García¹, Yirys Díaz-Olmos^{3,4}, Rodrigo Netto-Costa³, Wanderson D. DaRocha¹.

¹ Grupo de Genômica Funcional de Parasitos (GFP), Universidade Federal de Paraná.

² Universidad Simón Bolívar. Barranquilla, Colombia.

³ Instituto Carlos Chagas, Fiocruz-Paraná.

⁴ Universidad del Norte. Barranquilla, Colombia.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the etiological agent of Chagas disease, a neglected tropical disease affecting approximately 7 million people worldwide. The scarcity of molecular tools for genetic manipulation is a critical issue for functional genomics studies in *T. cruzi*. The CRE-*lox* system is a widely used method of achieving conditional targeted deletions, inversion, insertions, gene activation, translocation, and other modifications in chromosomal or episomal DNA. In the present study, the CRE-*lox* system was adapted to expand the current genetic toolbox for this hard-to-manipulate parasite. First, we tested an inducible system, in which a split version of CRE recombinase was activated by a GFP-dependent mechanism (CRE-DOG system). As proof-of-concept, an inverted tdTomato sequence flanked by head-to-head *loxP* sites as a reporter cassette for CRE activation was tested. However, the CRE-DOG approach resulted in very low recombination efficiencies, as shown by confocal microscopy. To improve recombination efficiencies, CRE recombinase was fused to the C-terminus of *T. cruzi* histone H2B, which carries the nuclear localization signal and is expressed in the prokaryotic system, and affinity purified to be transfected directly into epimastigotes (CREditing system). Protein transduction by electroporation allowed us to turn on gene expression using Tdtomato as a reporter gene, achieving recombination in up to 85% of parasites. This system was also tested for its ability to turn off gene expression, remove selectable markers integrated into the genome, and conditionally knock down the nitroreductase gene, which is involved in drug resistance. Additionally, CREditing also

enabled us to turn on gene expression directly in tissue culture trypomastigotes, which are even harder to transfect than epimastigotes. These results demonstrate the considerable advances in genomic manipulation of this parasite that may be possible with gain- or loss-of-function approaches.

INTRODUCTION

The etiological agent of human Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, is a kinetoplastid protozoan parasite with a complex lifecycle involving vertebrate and invertebrate hosts. To date, functional genomic investigations into *T. cruzi* have been severely hampered by a lack of affordable tools for genome-wide gene expression studies.

Clustered regularly interspaced short palindromic repeat with Cas9 (CRISPR-Cas9) analysis is an approach that has been successfully applied to *T. cruzi* (CHIURILLO et al., 2017; CRUZ-BUSTOS et al., 2018; LANDER et al., 2015; 2016; 2017; PENG et al., 2015; ROMAGNOLI et al., 2018; SOARES MEDEIROS et al., 2017). Two principal methods have been used to edit the genome of this protozoan: 1) endogenous expression of the nuclease Cas9 and sgRNA and 2) direct transfection of ribonucleoprotein complexes (SOARES MEDEIROS et al., 2017). Although CRISPR-Cas9 has been shown to be a relatively efficient method of ablation of endogenous genes (CHIURILLO et al., 2017; CRUZ-BUSTOS et al., 2018; LANDER et al., 2015; PENG et al., 2015; SOARES MEDEIROS et al., 2017) and tagging (LANDER et al., 2016; 2017; SOARES MEDEIROS et al., 2017), no work exists that shows the efficiency of CRISPR-cas9 in generating large genomic deletions in Trypanosomatids; however, it has been shown to be relatively inefficient in other models. A major observation of CRISPR-Cas9 is that larger the deleted fragment, lower the efficiency. It is therefore essential to use multiple sgRNAs to improve efficiency when deleting large fragments (SONG et al., 2016), which results in higher costs and increases the risk of off-target effects. Hence, the development of new strategies that allow gene manipulation on a large scale is imperative.

In *T. cruzi*, tightly regulated, highly efficient inducible expression systems for recombinant proteins are scarce. Such regulated gene expression systems that permit controlled expression

of exogenous genes provide important tools for examining the functional roles of encoded proteins. A strict regulatory system that can completely eliminate undesirable expression under some conditions but that permits high levels of expression under other conditions is essential for studying the effects of genes that are expressed at very low levels or for which the gene products are toxic.

The CRE-*lox* recombination system of the bacteriophage P1 is a widely used method of achieving conditional, targeted deletions, inversion, insertions, gene activation, translocation, and other modifications in chromosomal or episomal DNA (BERGEMANN et al., 1995; SAUER, 1998; TESTA; STEWART, 2000). In this system, site-specific recombinases either excise or invert DNA between short target sequences (34 bp), depending on the orientation of the target sequences. Direct repeats lead to excision of the DNA between the targets, leaving one copy of the target sequence as a “scar,” while inverted target sequences lead to a reversal of the orientation of the intervening DNA.

The use of site-specific recombination in genetic studies is frequently hampered by the difficulty of expressing recombinase in cells at the desired time and in the desired place (LEWANDOSKI, 2001). Moreover, the use of CRE expression vectors is constrained by the fact that prolonged exposure to the enzyme can be lethal to cells (CHEN; BEHRINGER, 2001; SILVER; LIVINGSTON, 2001). However, direct protein transduction or transfection of CRE recombinase circumvents the introduction of CRE-encoding nucleic acids into cells, thereby eliminating the risk of insertional mutagenesis and the genomic instability induced by continuous CRE expression (LOONSTRA et al., 2001; SCHMIDT et al., 2000). In addition, the activity of CRE may be dependent on an inducer provided by the experimenter, in which case it is possible to switch on CRE in any cell type. Two basic approaches to this have been developed in the last few years: placing CRE under the control of a regulatable promoter or using a fusion protein to modulate CRE activity with steroids (JULLIEN et al., 2007).

Previously, we showed that a conditional knockout using the DiCRE system, which is ligand-dependent, resulted in very low recombination efficiency in *T. cruzi* (KANGUSSU-MARCOLINO et al., 2014). In the present work, we adopt a CRE recombinase dependent

on GFP (CRE-DOG) (TANG et al., 2015) system and utilize direct protein transfection to improve the efficiency of recombination in this parasite.

RESULTS

CRE-DOG approach shown low recombination efficiency

We tested the CRE-DOG system in an effort to improve genomic rearrangements such as conditional gene deletions or inversions in *T. cruzi*. The name “CRE-DOG” refers to the combined action of two chimeric proteins bearing complementary split CRE fragments, each fused to a different GBP (Jullien et al, 2003; Tang et al., 2015). Because the enzyme is expressed as two independent molecules, CRE recombinase will only be active when GFP is present in the same cell (Figure 16A). In order to express CRE-DOG proteins in *T. cruzi*, a plasmid containing appropriated intercoding sequences flanking each of the two CRE-DOG components was constructed (pTREX_CRE-DOG_Hygro; Figure 16B) and stably transfected into epimastigote cells. To easily track the conditional activity of CRE recombinase in these cells, pTREX_FLEX tdTomato_Neo (Figure 16B), a reporter plasmid containing a floxed tdTomato, was also constructed and introduced by transfection into CRE-DOG-positive cells. This tester construct contains a promoter that drives transcription of an inverted tdTomato sequence flanked by loxP and lox2272 oriented head-to-head to allow tdTomato reversion, so its expression can be directly detected by fluorescence microscopy or flow cytometry (Figure 16C).

Since Pacheco-Lugo et al. (2017) showed that the transient nucleofection of epimastigotes with a pTREX-GFP-Neo vector can achieve up to 15% GFP-positive cells, we decided to test the efficiency of the CRE-DOG approach by providing GFP through a transient assay. After several attempts to transiently transfect epimastigote forms of *T. cruzi* carrying pTREX-FLEX TdTomato-Neo and pTREX CRE-DOG Hygro, we detected GFP expression as expected. However, tdTomato expression was not detected (data not shown). To address this negative result, the parasites were stably transfected with a third plasmid, pTREX-GFP-Puro. After drug selection with puromycin sulfate (~60 d), the triple-resistant parasites showed a similar growth profile to wild-type parasites (Figure 17A). At this point, when the

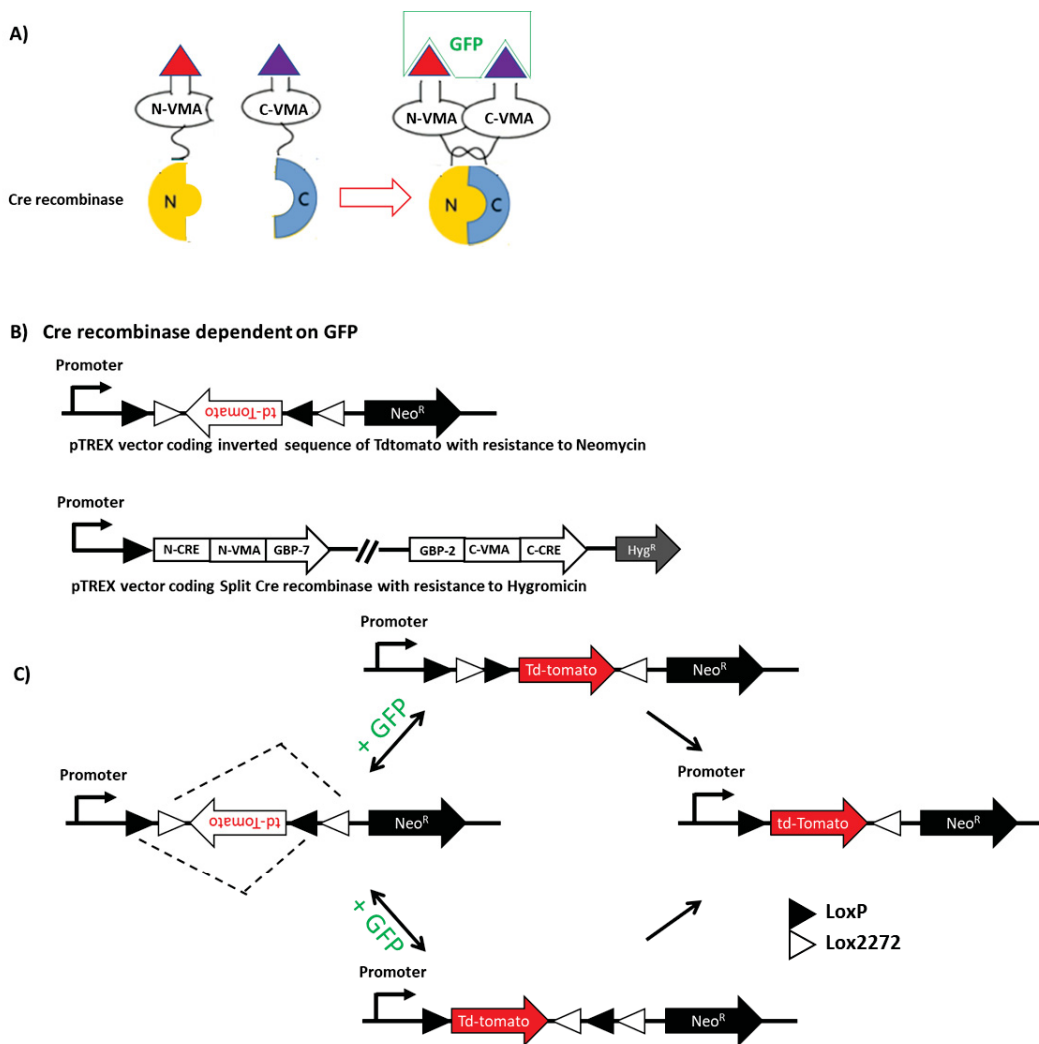


Figure 16. CRE-DOG approach. A) Schematic of CRE-DOG action. B-C) Schematic of chimeric constructs comprising CRE-DOG. D) GFP-induced recombination leads to expression of the gene reporter tdTomato.

parasites were analyzed for GFP and tdTomato expression, nearly 50% of parasites were GFP positive. However, we determined that less than 10% of the parasites were double-fluorescent (positive for both GFP and tdTomato) by confocal microscopy (Figure 17B). These results were confirmed by flow cytometry (data not shown), indicating that the CRE-DOG approach was inefficient in epimastigote forms of *T. cruzi*.

To test the efficiency of the CRE-DOG approach, epimastigote forms from *T. cruzi* (G strain) were electroporated with pTREX plasmids coding both Cre recombinase and Flex-tdTomato.

After drug pressure and selection, parasites doubly resistant (Neomycin and Hygromycin) were stably transfected with a plasmid coding GFP with resistance to puromycin sulfate and GFP expression was evaluated 60-days after transfection. At this point, nearly 50% of parasites were GFP positive. However, as shown in the figure 17, we observe a low number of double-fluorescent parasites expressing GFP and tdTomato when analyzed by confocal microscopy (less than 10%). These results were confirmed by flow cytometry (data not shown), indicating that the CREDOG approach was inefficient in epimastigote forms of *T. cruzi*.

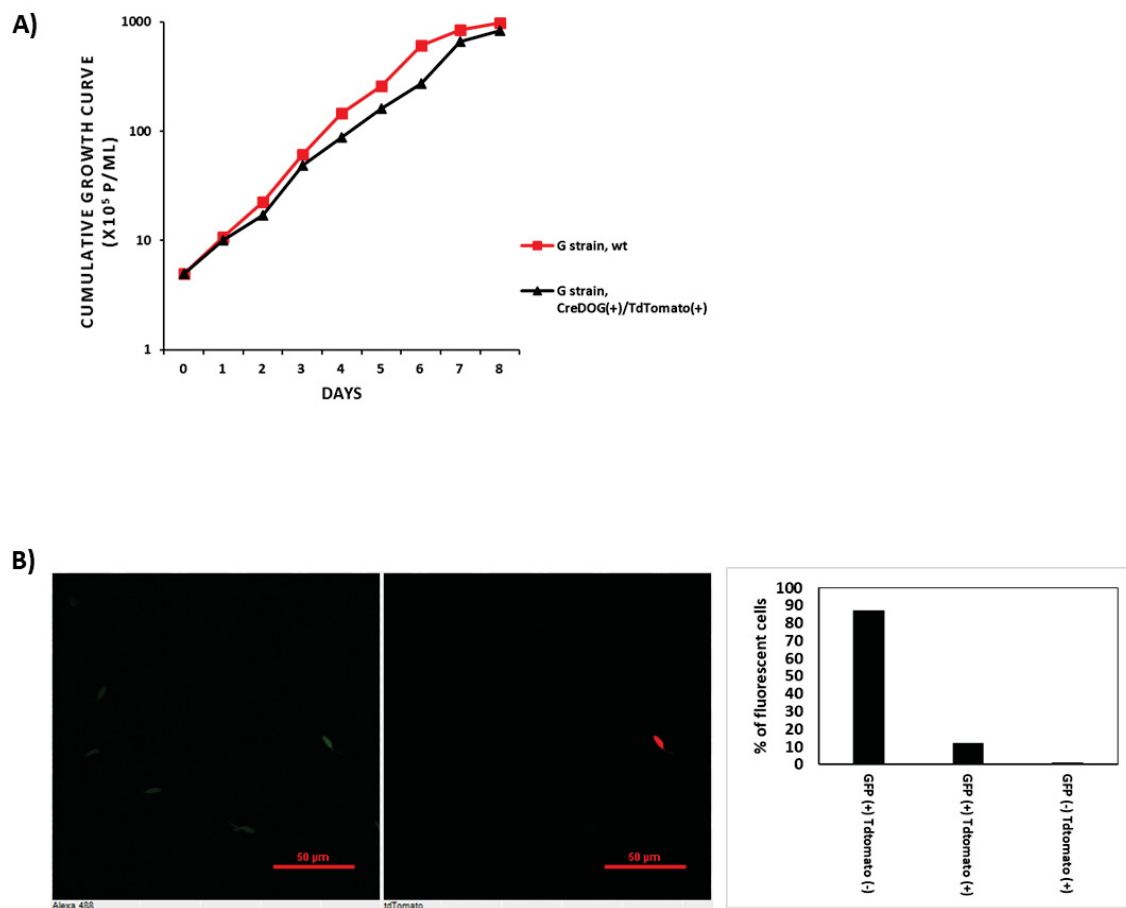


Figure 17. CRE-DOG approach is not functional in *T. cruzi*. **A)** Cumulative growth curve of the wild type and recombinant parasites. **B)** Epimastigote forms of *T. cruzi* were stably transfected with the constructs comprising Cre-DOG. A third plasmid coding GFP was electroporated in these parasites and GFP expression was confirmed by confocal microscopy. A low number of parasites expressed the gene reporter in the presence of GFP

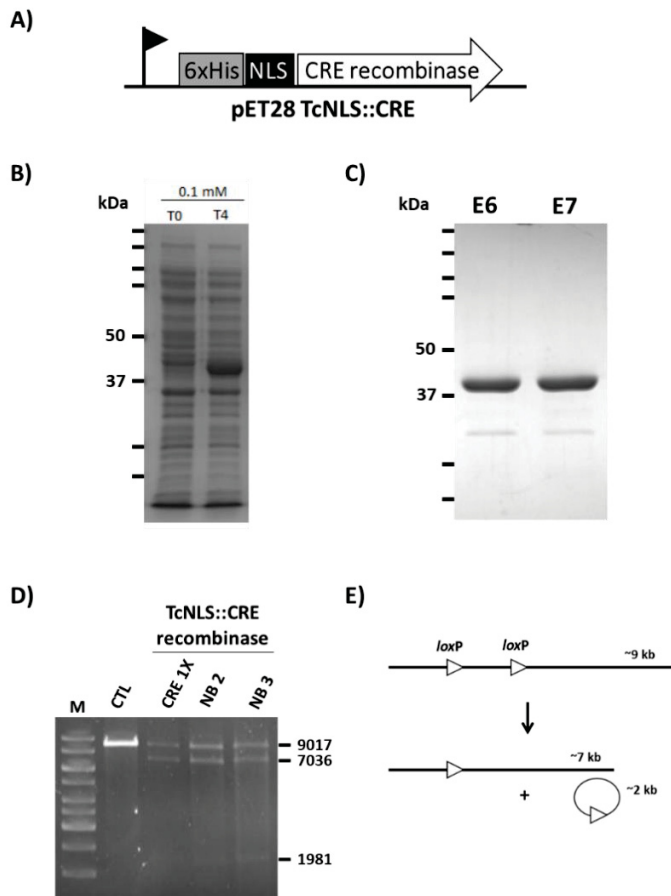


Figure 18. Expression and purification of CRE recombinase. **A)** Schematic of the TcNLS-Cre fusion protein. **B-C)** Purification of recombinant TcNLS-Cre from BL21, as analyzed by Coomassie blue staining of an SDS-PAGE. E6 and E7, eluted fractions. Numbers on the left indicate molecular weight (kDa) of markers protein. **D-E)** In vitro activity test of TcNLS-Cre using different buffer compositions. pROCK-FEKO-Pur_Neo plasmid was used as substrate for recombination (**E**). CTL: 800 ng of plasmid without TcNLS-Cre. CRE 1X (33 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, pH 7.5), NB2-3: NEB buffers 2 and 3, respectively.

CREditing using recombinant TcNLS::CRE recombinase can cause very efficient recombination

To improve the efficiency of recombination, we directly introduced biologically active CRE recombinase by protein electroporation in epimastigote forms of *T. cruzi*, since recombinant proteins, including CRE recombinase, have previously been delivered directly by electroporation in different cells (Deora et al., 2007; Furuhashi et al., 2019), and by Cas9 in *T. cruzi* (Soares-Medeiros et al., 2017, Burle-Caldas et al., 2018). To this end, we designed

a recombinant fusion protein referred to here as TcNLS::CRE, consisting of an N-terminal histidine tag for efficient purification from *Escherichia coli*, a NLS derived from histone H2B (Marchetti et al., 2000), and CRE recombinase (Figure 18A). Then, TcNLS::CRE was expressed in *E. coli* (Figure 18B) and affinity purification produced a very good yield (Figure 18C). Purified fractions of TcNLS::CRE were tested in vitro using a linearized plasmid DNA of 9 kb as substrate, containing two loxP sites in the same orientation flanking a 2 kb fragment (Kangussu-Marcolino et al., 2014). As shown by agarose gel electrophoresis of the in vitro assay, the TcNLS::CRE was able to recombine ~50% of the substrate at a different buffer composition after incubation at 37 °C for 1 h (Figure 18D, E). These results indicate that the sequences in the N-terminal domain of CRE (His tag and NLS) did not interfere with the function of the purified protein.

Next, TcNLS-CRE-purified fractions were electroporated in epimastigote cells carrying only pTREX-FLEX tdTomato-Neo (Flex-tdOFF-EPs) using the electroporation conditions previously reported (Pacheco-Lugo et al., 2017). Flow cytometry analyses (Figure 19A) and confocal microscopy images (Figure 19C) were used to precisely determine the efficiency of CREditting in epimastigote forms. After transfecting Flex-tdOFF-EPs cells with different molar concentrations of TcNLS::CRE recombinase, we observed high percentages (up to 50%–60%) of cells expressing the reporter tdTomato as early as 24 hpt (Figure 19A, B). Interestingly, CRE-mediated recombination was even higher (~88%) when Flex-tdOFF-EPs were re-transfected 6 d after the first electroporation (Figure 19E). However, when parasites were serially transfected at 2 d interval a reduction in the percentages of tdTomato expressing cells was observed, which can be explained by toxicity (Supplementary Figure 1).

The recombination event was also confirmed at the DNA level by performing PCR using primers designed to amplify only the reverted version of tdTomato (Figure 19D). As shown in Figure 16C, two sequential recombination events depending on CRE activity should occur to remove additional lox sites and make the recombination irreversible. Once two bands close to 1028 and 1228 pb were detected, we suspected that the bypass product was also being detected by PCR, since TcNLS::CRE was provided as recombinant protein. Additionally, this pattern was obtained from TcNLS-CRE treated cells (Figure 19D). In conclusion,

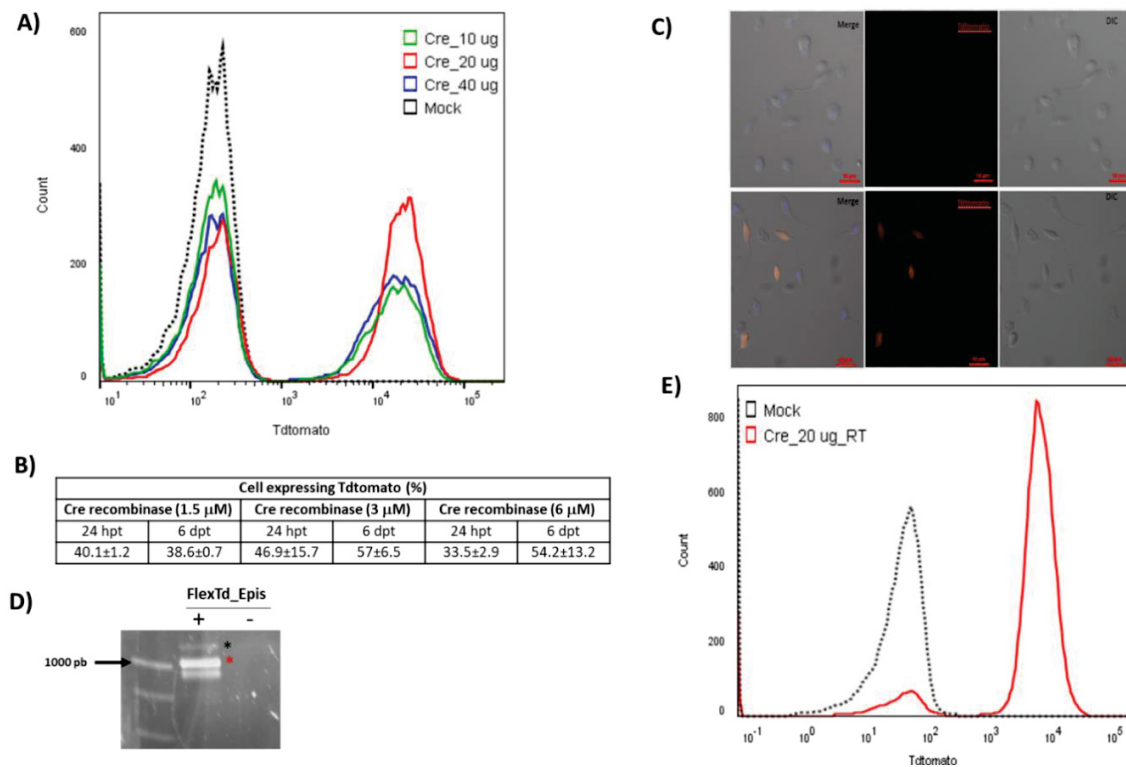


Figure 19. In vivo recombination with TcNls-Cre. **A)** FlexTd-Epis of G strain from *T. cruzi* were electroporated with different concentration of TcNls-Cre and the efficiency of recombination was evaluated by flow cytometry 24 hours post-transfection (hpt) and 6 days post-transfection (dpt). A representative experiment is shown. **B)** The table shows the efficiency of recombination determined by flow cytometry. Data are expressed as the mean of triplicates, representative of three independent experiments. **C)** FlexTd-Epis transfected with 20 μ g of TcNls-Cre were analyzed by confocal microscopy at 6 dpt. Scale bar, 50 μ m. **D)** Genomic DNA was extracted from the FlexTd-Epis mock and Cre-transfected and PCR was carried out to diagnosis the inverted version of tdTomato. Red and black asterisks show that one or two recombination events happened, respectively (Figure 1C). **E)** FlexTd-Epis were serially electroporated with 6-days interval and the cells expressing tdTomato were analyzed by flow cytometry. RT, Re-transfected.

recombinant TcNLS::CRE-dependent recombination is highly efficient, allowing the expression of tdTomato in epimastigote forms after transient transfection.

Recombinant TcNLS-Cre turned off GFP expression with high efficiency

We demonstrate the efficiency of CREditng in turning off gene expression in a single recombination event using different combinations of two lox sites: lox66 and lox71. When

head-to-head lox66 and lox71 recombine, a wild-type loxP site and a double mutant loxP (lox72) site are generated. CRE-mediated inversion using lox66 and lox71 tends to happen only in the forward direction since the lox72 site exhibits reduced binding affinity for CRE recombinase (Albert et al., 1995). As shown in Figure 20A, a plasmid containing GFP (green fluorescent protein) floxed by lox66 and lox71, called pTREX-Floxed GFP-Neo, was created. In parasites carrying this construct, it is easy to obtain homogeneous populations of epimastigotes stably expressing GFP (GFP ON) until CRE recombinase is delivered by electroporation (Figure 20B). After CRE treatment, part of the parasite population showed a reduction in parasite fluorescence intensity 24 and 48 hpt, with ~65% of the parasites showing the same fluorescence as wild-type cells 6 dpt. This complete loss of fluorescence 6 dpt may be related to GFP stability.

TcNLS-CRE works independently of genomic context and can be used for selectable marker removal

The high efficiencies of recombination shown with both reporters, TdTomato (turned-ON) and GFP (turned-OFF), using a construct that can be kept episomal or integrated into a ribosomal RNA locus (Lorenzi et al., 2003) prompted us to test the functionality of the CREdit protocol in an endogenous locus of the parasite. Using the integrative vector pROCK (DaRocha et al., 2004b; Kangussu-Marcolino et al., 2014) we obtained a population carrying the Puromycin-HSV-TK cassette flanked by two loxP sites in the same orientation at the beta-tubulin locus (Figure 21A). After CRE-mediated recombination, we expected a 1981 bp deletion that could be detected by PCR amplification of the CRE “scar,” a 295 pb PCR product (Kangussu-Marcolino et al., 2014) (Figure 21B).

To estimate recombination efficiency, we carried out single-cell cloning. We found that 12 out of 15 clones were positive for CRE scar amplification, indicating an efficiency of almost 80% (Figure 21C). Taken together, these results demonstrate the utility of protein delivery by transfection to edit an endogenous locus in the parasite.

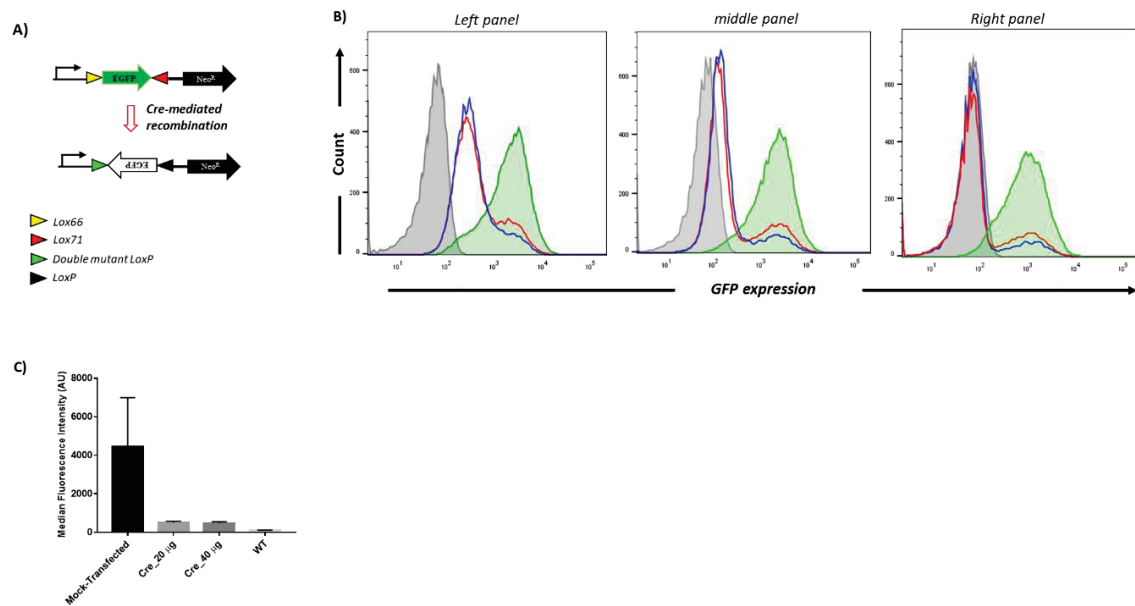


Figure 20. Cre-mediated recombination show high efficiency to turn-off the expression of GFP. A) Epimastigote forms from *T. cruzi* were stably transfected with a “floxed GFP plasmid” where GFP expression was always ON. **B)** Cre recombinase was electroporated in these populations and GFP decay was checked by flow cytometry 24 (left panel) and 48 (middle panel) hours post-transfection, and 6-day post-transfection (right panel). The median fluorescence intensity of GFP 24 hpt is shown in **(C)**. Data represent a representative experiment (from three independent experiments), using 20 (red histogram) and 40 µg (blue histogram) of Cre recombinase. Mock-Cre population is shown in green and wild-type population is shown in grey.

Conditional overexpression of NTR and aldo-keto reductase using CREditing

Benznidazole and nifurtimox are nitroheterocyclic derivatives that need to be activated by intracellular nitroreductases to act effectively. In *T. brucei* (Hall et al., 2011) and *Leishmania donovani* (Wyllie et al., 2013), NTR overexpression generates parasite populations that are more sensitive to these pro-drugs. With the aim of testing the conditional expression of genes related to drug resistance/susceptibility in *T. cruzi*, in the present study, parasites overexpressing the TcNTR gene were generated using pTREX-FLEX NTR ON-Neo (see section 2 Materials and methods). Parasite populations from a Dm28c clone overexpressing a floxed version of NTR (NTR-ON) were transfected twice (6 d interval) with TcNLS::CRE recombinase to generate populations in which NTR expression was turned off (NTR-OFF) (Figure 22A). Both populations (NTR-ON and NTR-OFF) were incubated with increasing

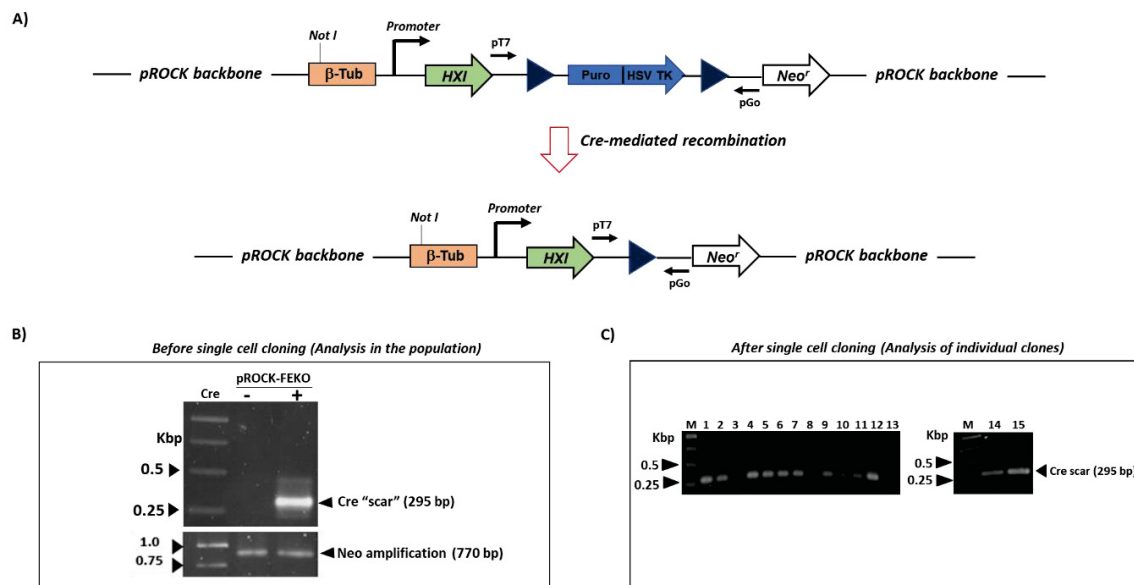


Figure 21. TcNls-Cre is functional in an endogenous locus. A) Epimastigote forms of *T. cruzi* were stably transfected with pROCK-FEKO-Pur, an integrative vector in the beta-tubulin locus carrying a Puromycin-HSV TK cassette flanked by LoxP sites (blue arrowheads). After transfection with TcNls-Cre (+) or mock-transfected with electroporation buffer (-), the recombination was evaluated by PCR, using the pT7 and pGo primers (black arrows). The recombination generates a 295 bp PCR product corresponding to TcNls-Cre recombination scar, named CRE Scar. As positive amplification control NeoR-For (5'-CGACCCTGCAGCCAATATGGGATCG-3') and NeoR-Rev (5'-TCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAGGCG-3'), primers were used to detect NeoR gene (770 bp) (B). Analysis of individual clones shown a high efficiency of recombination, reaching 80% (C).

concentrations of benznidazole (Bz) for 72 h and cell viability was assessed by alamarBlue staining. As shown in Figure 22B, the NTR-ON population was shown to be more sensitive to Bz than its floxed counterpart. This result demonstrates the utility of the CREditing system to interrogate gene overexpression in the context of drug resistance.

Unlike NTR, it has been shown that overexpression of aldo-keto reductase (AKR) improves Bz resistance in *T. cruzi* (González et al., 2017). Again, *T. cruzi* populations overexpressing floxed AKR (pTREX-FLEX AKR ON-Neo) and counterpart AKR-OFF populations were generated after transfecting epimastigotes with TcNLS-CRE recombinase (Figure 22C). These populations were then treated with Bz and a tendency to resist to drug treatment was

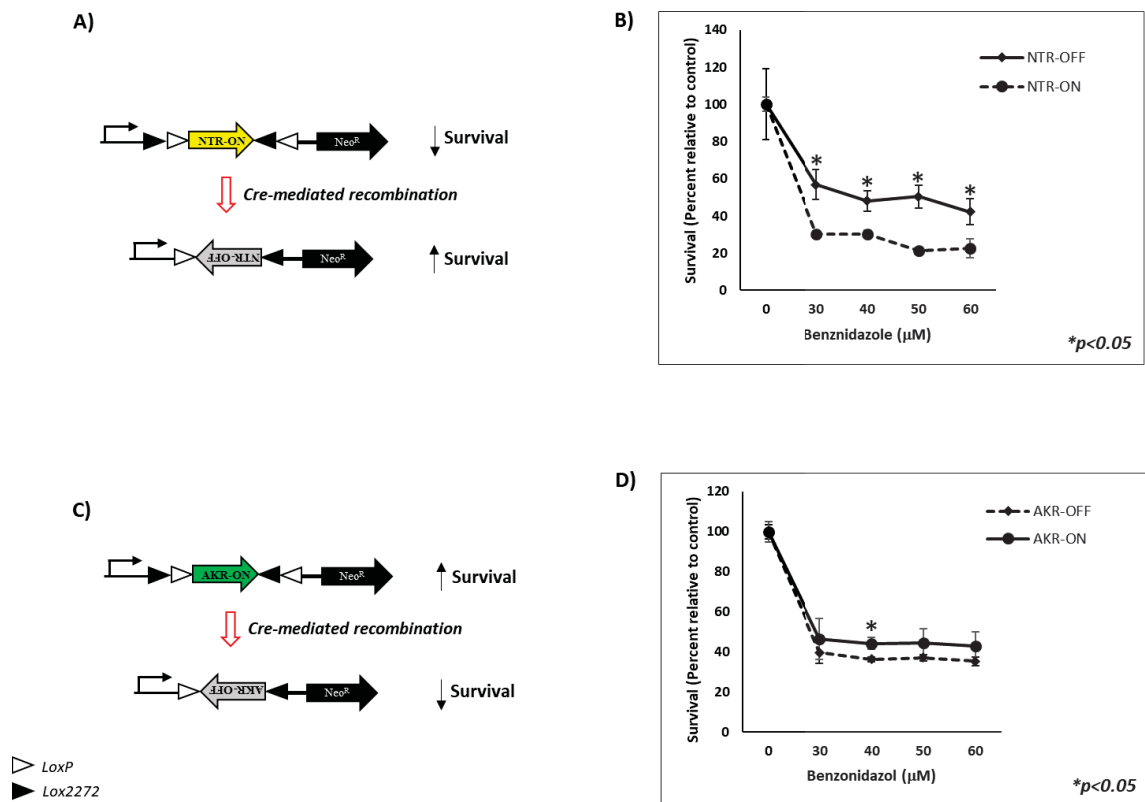


Figure 22. Conditional NTR and AKR overexpression using CREditing. A, C) Schematic representation of the floxed-NTR and AKR overexpressing cassettes in epimastigote forms of *T. cruzi* Dm28c clone (NTR- and AKR-ON). CREdited populations were induced by transfecting CRE recombinase, generating parasite populations in which NTR and AKR were turned off (NTR and AKR-OFF). Both populations, NTR-ON and NTR-OFF (B) and AKR-ON and AKR-OFF (D), were incubated with different concentrations of benznidazole for 72 h and cell viability was evaluated using the alamarBlue test. Experiments were performed in triplicate with data presented as the means \pm SD. $P < 0.05$.

detected; however, a statistically significant difference was only seen at 40 μ M of Bz (Figure 22D).

Gene expression can be modulated in tissue culture-derived trypomastigotes by CREditing

Genetic manipulation of infective forms of *T. cruzi* is challenging since metacyclic trypomastigotes (MT) and tissue culture-derived trypomastigotes (TCTs) are non-replicative. Once CREditing was working well in epimastigotes, we decided to test whether TcNLS-CRE

could be efficiently transfected in TCTs. First, LLC-MK2 cells were infected with MT and TCT forms derived from epimastigotes stably carrying pTREX-FLEX tdTomato-Neo. Then, TCTs carrying floxed tdTomato (FlexTd-OFF_TCTs) were recovered from the supernatant after two rounds of infection. Next, FlexTd-OFF_TCTs were harvested by centrifugation, resuspended in Tb-BSF buffer, and transfected with 20 μ g of TcNLS-CRE recombinase. After transfection, FlexTd-OFF_TCTs cells were transferred to RPMI medium and incubated with LLC-MK2 cells at a MOI of 1. The slides were washed and the cells were fixed and analyzed by confocal microscopy 24, 48, and 72 hpi. As shown in Figure 23, TCTs transfected with TcNLS-CRE were infective to LLC-MK2, and we were able to detect FlexTd-OFF_TCTs that became FlexTd-ON_TCTs as early as 24 hpi with intracellular forms showing high levels of tdTomato expression. In summary, CREditng allowed us to manipulate gene expression through recombination in both epimastigote (replicative and non-infective) and TCT (non-replicative and infective) forms of *T. cruzi*.

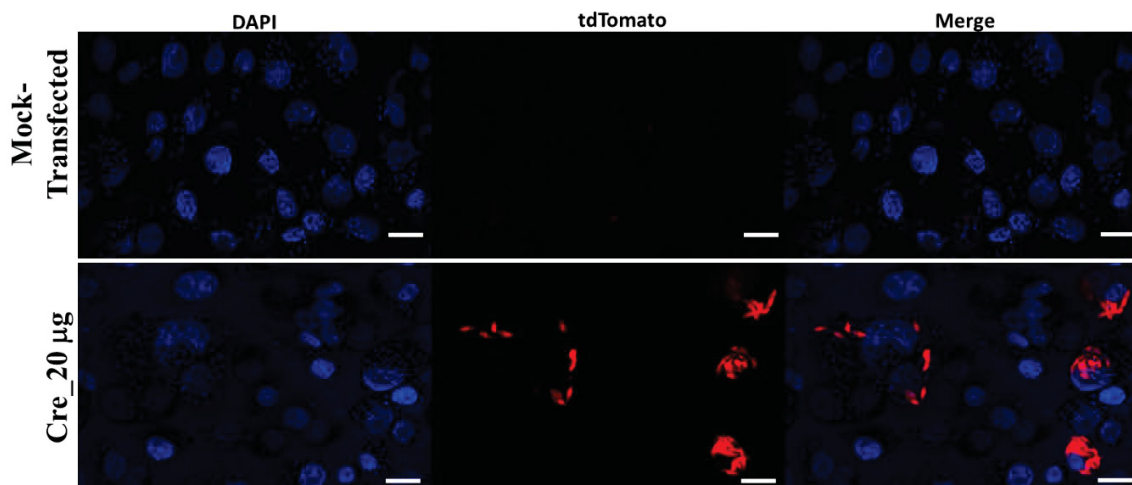


Figure 23. TCT forms of *T. cruzi* were efficiently transfected with Cre recombinase. Floxed-tdTomato epimastigotes (tdTomato turned-off) were differentiated in metacyclic trypomastigote forms, which were used to infect LLC-MK2 cells and TCT forms were obtained from the supernatant after two rounds of infection. TCT forms were once washed with Tb-BSF buffer, mock-transfected with electroporation buffer (*upper*) or transfected with 20 μ g of Cre recombinase (*lower*) and immediately used to infect LLC-Mk2 cells, at a MOI of 1. Forty hours post-infection cells were fixed and analyzed by confocal microscopy. DNA is stained using DAPI (blue). Scale bars = 20 μ m.

DISCUSSION

Functional genomic approaches in *T. cruzi* are challenging and become even harder as the parasites enter the non-replicative stages of their lifecycle. This is largely due to the scarcity of regulated systems that allow tight regulation of gene expression. The best system for inducible expression is the T7 RNA polymerase/Tet Repressor system (DaRocha et al., 2004a; Taylor and Kelly, 2006). However, this system is not widely used, probably because of the necessity of previous modification of a cell line to express the components of the system; also, it has shown some leakiness in the absence of the inducer (tetracycline) (Laverrière et al., 2012; Piacenza et al., 2007; Taylor and Kelly, 2006). It would therefore be advantageous to have a system that allows transgene expression in a very well-controlled manner. In the present work, we developed a CREediting system that could be used to survey gene function in different stages of the lifecycle of *T. cruzi*.

First, we proposed to evaluate the functionality of the CRE-DOG system as a tool to regulate gene expression. In the CRE-DOG system, the CRE recombinase is split into two inactive fragments that are fused to GFP binding proteins, which dimerize depending on GFP expression (Tang et al., 2015). As shown in Figures 16 and 17, the CRE-DOG approach was not efficient at inducing the expression of the reporter tdTomato under the test conditions. Additional steps are necessary to optimize the system. However, due to the multiple components of the system, it can be tricky and make the system useless. It is important to highlight that the constitutive expression of CRE recombinase has been shown to be toxic in several cell types, including in *T. brucei* (Barrett et al., 2004; Loonstra et al., 2001; Schmidt et al., 2000; Silver and Livingston, 2001). Thus, it is likely that cells expressing high levels of GFP can induce dimerization of CRE-DOG recombinase, which could ultimately lead to toxicity in GFP-positive parasites, causing selective cell death. We found that using successive rounds of electroporation with the enzyme instead of increasing the number of tdTomato positive cells led to a reduction in fluorescence. This result indicates that elevated levels of CRE recombinase activity could be toxic (Supplementary Figure 1).

Due to the relatively high efficiency of genome editing shown by electroporation of recombinant Cas9 in *T. cruzi* (Soares Medeiros et al., 2017) Burle-Caldas et al., 2018), we expected a similar result for CRE recombinase, which could also circumvent the toxicity

issue caused by constitutive expression of CRE recombinase. Our results demonstrate that the delivery of a recombinant version of CRE recombinase fused to a *T. cruzi* nuclear localization signal by protein electroporation in epimastigote forms, allowing the gene expression of fluorescent reporters to be turned on or turned off using different combinations of lox sites. In addition, we showed that this system could be useful for interrogating gene function in the context of drug resistance mechanisms. This protocol resulted in high recombination efficiencies as early as 24 hpt in replicative forms of the parasite, reaching up to 60% of the cells (Figures 18 and 19). Previous reports have shown that transient transfections of plasmid DNA for reporter gene expression in epimastigote forms result in between 15 and 35% positive cells (Olmo et al., 2018; Pacheco-Lugo et al., 2017), which is much lower than shown here using purified protein.

Over the last 20 years, the tetracycline-inducible system in *T. brucei* has been extremely effective in enabling functional genomic research. However, in contrast to *T. brucei*, in which reporter gene expression was controlled over a range of four orders of magnitude in response to tetracycline, relatively high expression levels of the regulated gene were detected in *T. cruzi* in the absence of tetracycline and a maximum of 150-fold increase in the expression was achieved after tetracycline addition (DaRocha et al., 2004a). The TcNLS-CRE-mediated recombination can cause very tight regulation, since in OFF mode the gene of interest (GOI) is encoded by the non-transcribed strand.

In general, when gene function is interrogated through overexpression or knockout of a GOI, it is carried out in replicative forms (epimastigotes), due the fact that they grow more easily and the protocol for their genetic manipulation is standard. With conventional approaches, epimastigotes are transfected and the constitutive expression of a GOI will causes biological changes/adaptations throughout the cell cycle that may affect the phenotype, causing overexpression of or blocking gene expression at the desired stage. However, CREditng allows deletion or overexpression without drug selection at almost any time in extracellular stages. In the present work, we showed that gene manipulation is possible in some forms of the parasite, specifically epimastigotes and tissue-derived trypomastigotes, though direct electroporation of the CRE recombinase protein. As shown in Figure 23, confocal microscopy analysis showed between 10% and 20% infected cells 24 and 48 hpi,

respectively. Although the efficiency seems to be low, methods can be designed for enrichment of these populations through cell sorting, allowing more precise analysis (Padmanabhan et al., 2014). To our knowledge, there is only one work in the literature manipulating TCTs through the electroporation of plasmid DNA. In that work, efficiencies of 5% and 95% were obtained before and after cell sorting (Padmanabhan et al., 2014).

Gene knockout has been shown to be a powerful tool to explore gene function in *T. cruzi*. We asked if active CRE recombinase could remove a gene integrated in a locus of the parasite. We transfected epimastigote forms with the pROCK-FEKO-PUR_Neo plasmid, an integrative vector at the tubulin locus (Kangussu-Marcolino et al., 2014). Recombination led to the excision of 1,981 bp, which results in a scar fragment that is easily detected by short-cycle PCR. This fragment is 295 bp long, which corresponds to the length of a single *loxP* site as well as up- and downstream sequences (See Figure 21). Interestingly, when we analyzed individual clones of the floxed population we found a higher efficiency of recombination (80%, 12 out 15 clones) (Figure 21C). Several factors have been shown to affect the efficiency of CRE excision on the *lox* pair. One important factor is the nucleotide sequence identity in the spacer region of the *lox* site. Engineered *lox* variants which differ in the spacer region tend to have varied but generally lower recombination efficiencies compared to wild-type *loxP*, presumably through affecting the formation and resolution of recombination intermediates (Lee and Saito, 1998). In addition, the genetic location of the floxed sequences affects recombination efficiency, probably by influencing the availability of DNA by CRE recombinase (Liu et al., 2013). So, the higher efficiency of recombination seen for the floxed cassette puromycin-HSV-TK can be explained by the flanking *loxP* sites (instead of the pairs *lox2272/loxP* and *lox66/lox71*, used for the reporters tdTomato and GFP, respectively) and the genomic locus (beta-tubulin in the last case).

Here, we applied CRE-*lox* using constructs carrying the *lox* sites of interest at desirable positions. However, advances in CRISPR-Cas9 technology in *T. cruzi* allows the insertion of *loxP* sites flanking the GOI so that recombination can be induced (inversion or deletion, depending on the orientation of the *loxP* sites) by transfecting active CRE recombinase. This combined approach can help to evaluate the phenotype at specific stages of the lifecycle of

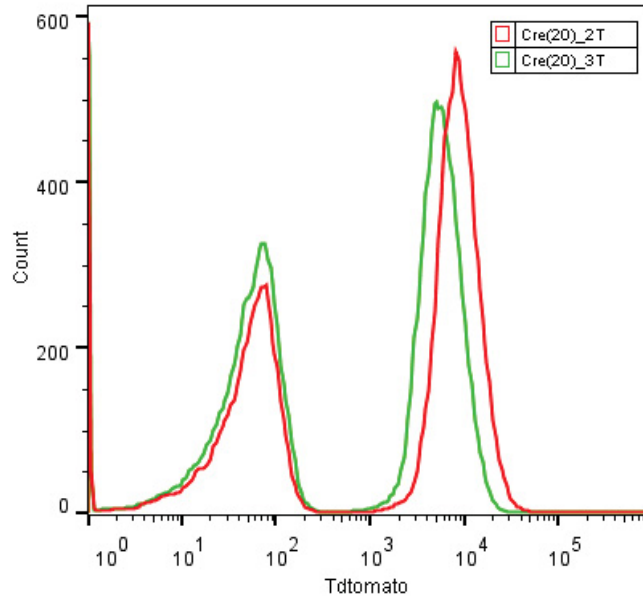
the parasite by introducing the lox sites in epimastigotes using Cas9, followed by recombination at a particular stage.

In summary, application of the CRE-lox system tested here allowed gene expression to be turned on or off at specific stages (epimastigotes and TCTs) and the deletion of a desired sequence integrated in the genome without the need for a previously modified parasite to express CRE recombinase or its variants.

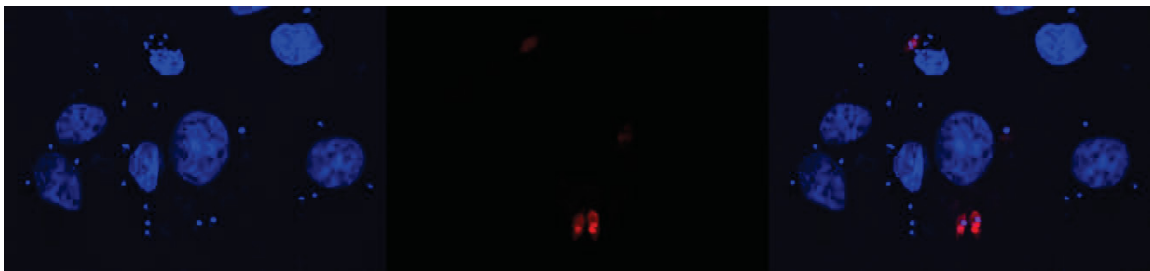
CONCLUSION

Our results show that CREditng represents a valuable genetic tool for the functional genomics toolbox of *T. cruzi*. The CRE-loxP technology described here provides a versatile tool to delete or invert sequences that can be applied to remove engineered selection cassettes containing drug-selection cassettes floxed by lox sites, so after successful drug selection, the selectable marker can be removed and reused for another round of stable transfection.

SUPPLEMENTARY MATERIAL



Supplementary figure 1. FlexTd-Epis transfected with CRE recombinase at 2-days interval. Epimastigote forms of G strain from *T. cruzi* were serially transfected with 20 μ g of CRE recombinase each time, using the electroporation conditions described in the material and methods section. Cells expressing tdTomato were analyzed by flow cytometry 48 hours after last transfection. 2T: two rounds of transfections. 3T: three rounds of transfections.



Supplementary figure 2. TCT forms of *T. cruzi* were efficiently transfected with Cre recombinase. TCT forms were transfected as described in the figure 23 and analyzed by confocal microscopy 24 hours post-transfection.

MATERIAL AND METHODS

Parasites and culture conditions

Axenic cultures of G strain *T. cruzi* epimastigotes were maintained at 28°C in liver infusion tryptose (LIT) medium containing 10% FBS, streptomycin sulfate (0.2 g/l), and penicillin (200,000 U/l). Epimastigotes at the exponential growth phase were used in all experiments.

In vitro metacyclogenesis and infection

Metacyclic trypomastigotes were obtained by in vitro differentiation in defined medium (TAU3 AAG) as described previously (Contreras et al., 1985). Briefly, stationary phase epimastigotes (5×10^7 cells/mL) were subjected to nutritional stress in TAU medium for 2 h and then transferred to TAU3 AAG to initiate differentiation. To obtain tissue culture-derived trypomastigotes, LLC-MK2 cells (ATCC, CCL-7) were maintained in RPMI medium supplemented with 5% fetal bovine serum, 100 IU mL⁻¹ penicillin, 10 mg mL⁻¹ streptomycin, and 2 mM glutamine at 37°C and 5% CO₂. When cultures reached 60% confluence, cells were infected with metacyclic trypomastigotes at a concentration of 100 parasites/host cell. After 24 h, cells were washed with PBS and fresh RPMI medium was added. After 96 h of infection, trypomastigotes were collected from culture supernatants by centrifugation at $3,000 \times g$ for 10 min.

Plasmid construction

The plasmids pCAG-N-CreintG and pCAG-C-CreintG, encoding N- and C-terminal sequences from CRE recombinase fused to GFP binding (GBP) domains, respectively, were a gift from Dr. Connie Cepko of Harvard University (available from Addgene, #69572 and #69573) (Tang et al., 2015). Each half of the optimized GFP-dependent CRE recombinase was transferred to a pTREX-GFP-Hygro vector (DaRocha et al., 2004b) through successive subcloning steps. First, we cloned the C-terminal domain of CRE (containing CVMA and GBP2 sequences) in the pTREX-Hygro vector previously digested with EcoRV and NotI, to generate the intermediate vector pTREX-CCre-hygro. Subsequently, the N-terminal domain of CRE (containing N-VMA and GBP7 sequences) was amplified by PCR, digested with

BglII, and cloned in the BamHI site of the intermediate vector pTREX-CCre-Hygro. Orientation of the construct was confirmed and the pTREX-CRE-DOG-Hygro plasmid, which carries both halves of CRE recombinase, was obtained.

Reporter plasmids for CRE recombinase activity in *T. cruzi*

The first reporter plasmid was constructed based on pAAV-FLEX-tdTomato, which was a gift from Dr. Edward Boyden (Addgene plasmid #28306). The cassette, containing two pairs of loxP and lox2272 sites oriented head-to-head and flanking the inverted tdTomato coding sequence, was subcloned into pTREX-GFP-Neo (DaRocha et al., 2004b), thus creating pTREX-FLEX tdTomato-Neo (Figure 16). The second reporter plasmid (pTREX-Floxed GFP-Neo) was constructed by cloning a fragment containing GFP flanked by lox66 and lox71, oriented head-to-head, from pGL2332 (Santos et al., 2017), a gift from Dr. Luiz R. O. Tosi, into pTREX-GFP-Neo (DaRocha et al., 2004b) (Figure 20A).

Construction of a plasmid for expression of full-length CRE recombinase in *E. coli*

The nuclear localization signal (NLS) on histone H2B (Marchetti et al., 2000) of *T. cruzi* was amplified by PCR using the primers TcH2B_FOR_XbaI (GCATCTAGAATGGCCACCCCAAGAGCTCGTC) and TcH2B_REV_BamHI (CATGGATCCATGGTTGTTGATCGACTTGAG). The PCR fragments were digested with XbaI and BamHI and cloned into the NheI and BamHI sites of pET28a(+) (Novagen), generating the vector pET28a-TcNLSH2B. Then, CRE recombinase was amplified by PCR with the primers CRErec_FOR-BglII (ACCAAGATCTAGAATGTCCAATTTACTGACC) and CRErec_REV-HindIII (TTTTAAGCTTAATGGCTAATCGCCATCTTCCAGC) using pLEW100-CRE, which was a gift from Dr. John Donelson, as template. The PCR product was digested with BglII and HindIII and cloned into the BamHI and HindIII sites of pET28a-TcNLSH2B, generating the pET28a-TcNLSH2B-Cre vector.

Construction of the floxed version of nitroreductase

First, nitroreductase (NTR) from *T. cruzi* Y strain epimastigotes was amplified by PCR using the primers NTR-For (TACTTCCAATCCATGAGGAGAAATGACATAAAAAGACGC) and NTR-Rev (TATCCACCTTTACTGTCAAACCTTTCCCCACCGAACCAA). The amplified NTR sequence was cloned in the pCR2.1TOPO vector and sequenced. The TcNTR

sequence was removed from pCR2.1-TcNTR through double digestion with SpeI and EcoRV. This sequence was finally cloned in a version of pTREX with a multiple cloning site flanked by lox2272 and loxP sites, generating the pTREX-FLEX TcNTR-ON vector. In this context, ON refers to a sequence that is always expressed after transfection. To generate the OFF version of this vector, CRE recombinase was serially transfected as described above, with a 6 d interval between transfections.

Transfection and drug selection

Trypanosoma cruzi G strain and Dm28c clone epimastigotes were transfected as previously reported (Pacheco-Lugo et al., 2017). In brief, 2×10^7 epimastigotes in the exponential growth phase were washed with Tb-BSF electroporation buffer (Schumann Burkard et al., 2011) and resuspended in 100 μ L of Tb-BSF. The parasites were electroporated in a Nucleofector 2b Device (Lonza) using the program X-014. After transfection, the parasites were transferred to 5 mL of LIT medium and incubated at 28°C, and 24 h post-transfection (hpt) the cultures were diluted 1/5 and G418 (250 μ g mL⁻¹) or hygromycin B (500 μ g mL⁻¹) was added to select recombinant parasites. For TcNLS-Cre transfection, different molar concentrations were transfected as described above using 3×10^6 parasites and the U-033 program. Parasites were recovered in 5 mL of complete LIT medium.

Epimastigote sensitivity to benznidazole

The susceptibility of epimastigotes overexpressing NTR (NTR-ON) or recombined epimastigotes (NTR-OFF) to benznidazole (Bz) was evaluated as follows. A total of 5×10^5 epimastigotes mL⁻¹ were cultured with various concentrations of Bz (0–60 μ M) in quintuplicate for 72 h at 28°C in 96-well microtiter plates in a final volume of 100 μ L. The plates were then incubated with 10 μ L of alamarBlue™ Cell Viability Reagent (ThermoFisher Scientific) for 90 min and the reduction of resazurin to resorufin was measured at an excitation of 530 nm and an emission of 590 nm in a Tecan Safire Multimode Microplate Reader.

PCR analysis

To detect recombination in FlexTd-Epis reporter cells, PCR reactions were performed using the oligonucleotides HXI87_For (TTTTAGATCTTTCTTCAAAATATGCAGCGG) and

TdTom_Rev (CATGTTGTTGTCCTCGGAGGAG). These primers amplify only the inverted version of TdTomato. First, CRE-mediated excision of the cassette PurR-HSV_TK in FEKO-Epis reporter cells was carried out as previously reported (Kangussu-Marcolino et al., 2014). All PCRs were performed using Platus Taq DNA polymerase (Sinapse Biotecnologia) according to the manufacturer's protocol.

In vitro assay for CRE recombinase activity

As a substrate to test in vitro, we used the vector pROCK-FEKO-PUR-Neo digested with NotI. This plasmid contains a fusion of the puromycin resistance gene and the HSV-TK gene, flanked by two *loxP* sites in the head-to-head orientation (Kangussu-Marcolino et al., 2014). For each reaction, 18 μ M of purified CRE recombinase was used with 900 ng of the linearized plasmid as a substrate. The reaction was carried out in a final volume of 30 μ L using three different buffers: NEB buffer 2 (NB2), NEB buffer 3 (NB3), and a 1X CRE Recombinase Reaction Buffer (CRE 1X; 33 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, pH 7.5) (Figure 18).

Protein purification

CRE proteins were expressed using *E. coli* strain BL21(DE3) carrying the plasmid pET28-TcNLS::Cre, which encodes a hexa-histidine tag at the N-terminus followed by a H2B histone-derived nuclear localization signal and CRE recombinase (see Figure 18A). First, *E. coli* was cultured at 37°C for 2 h with shaking. Protein expression was then induced using 0.1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside. After 2.5 h, the cells were lysed with lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 10 mM imidazole, 1 mM benzylsulfonyl fluoride, 1 mM dithiothreitol, pH 8.0). Next, TcNLS-Cre proteins were purified using an Ni-NTA column with washing buffer (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 20 mM imidazole, pH 8.0), eluted with elution buffer (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 500 mM imidazole, pH 8.0), and further purified using a gel filtration column (HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR; GE healthcare, Chicago, IL, United States) using Buffer A (20 mM HEPES, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM dithiothreitol, pH 7.4). Proteins were dialyzed with HBS (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 25 mM glucose) and stored in single-use aliquots at -80°C.

Flow cytometry analysis

For flow cytometry, 2.0×10^6 mock or CRE-transfected parasites were washed and the pellet was resuspended in PBS 1X. Parasites were analyzed in a FACS Aria Flow Cytometry 24 hpt and 6 d post-transfection (dpt). In each case, 20,000 events were analyzed. The data were manually analyzed using the FlowJo data analysis software package (V10) (TreeStar, USA).

Confocal microscopy analysis

Slides were examined using a Nikon A1RSiMP confocal laser scanning microscope (NIKON, Tokyo, Japan). Cells containing multiple parasites were imaged in three dimensions (z-stacking) to allow precise counting of amastigotes (using 20× or 60× objective lenses with an appropriate scan zoom for the particular cell and number of parasites). The imaging software NIS Elements 4.20 (NIKON, Tokyo, Japan) was used to visualize the images and produce animations in 3D using the z-stacks.

REFERENCES

Albert, H., Dale, E. C., Lee, E., and Ow, D. W. (1995). Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant lox sites placed in the plant genome. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 7, 649–659.

Bergemann, J., Kühlcke, K., Fehse, B., Ratz, I., Ostertag, W., and Lothar, H. (1995). Excision of specific DNA-sequences from integrated retroviral vectors via site-specific recombination. *Nucleic Acids Res.* 23, 4451–4456.

Burle-Caldas, G. A., Soares-Simões, M., Lemos-Pechnicki, L., DaRocha, W. D., and Teixeira, S. M. R. (2018). Assessment of two CRISPR-Cas9 genome editing protocols for rapid generation of *Trypanosoma cruzi* gene knockout mutants. *Int. J. Parasitol.* 48, 591–596. doi:10.1016/j.ijpara.2018.02.002.

Chen, C.-M., and Behringer, R. R. (2001). CREating breakthroughs. *Nat. Biotechnol.* 19, 921–922. doi:10.1038/nbt1001-921.

Chiurillo, M. A., Lander, N., Bertolini, M. S., Storey, M., Vercesi, A. E., and Docampo, R. (2017). Different Roles of Mitochondrial Calcium Uniporter Complex Subunits in Growth and Infectivity of *Trypanosoma cruzi*. *mBio* 8, e00574-17. doi:10.1128/mBio.00574-17.

Contreras, V. T., Salles, J. M., Thomas, N., Morel, C. M., and Goldenberg, S. (1985). In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol. Biochem. Parasitol.* 16, 315–327.

Cruz-Bustos, T., Potapenko, E., Storey, M., and Docampo, R. (2018). An Intracellular Ammonium Transporter Is Necessary for Replication, Differentiation, and Resistance to Starvation and Osmotic Stress in *Trypanosoma cruzi*. *mSphere* 3, e00377-17. doi:10.1128/mSphere.00377-17.

DaRocha, W. D., Silva, R. A., Bartholomeu, D. C., Pires, S. F., Freitas, J. M., Macedo, A. M., et al. (2004). Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi* : improving vectors and electroporation protocols. *Parasitol. Res.* 92, 113–120. doi:10.1007/s00436-003-1004-5.

Deora, A. A., Diaz, F., Schreiner, R., and Rodriguez-Boulan, E. (2007). Efficient Electroporation of DNA and Protein into Confluent and Differentiated Epithelial Cells in Culture. *Traffic* 8, 1304–1312. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00617.x.

Furuhata, Y., Sakai, A., Murakami, T., Morikawa, M., Nakamura, C., Yoshizumi, T., et al. (2019). A method using electroporation for the protein delivery of Cre recombinase into cultured Arabidopsis cells with an intact cell wall. *Sci. Rep.* 9. doi:10.1038/s41598-018-38119-9.

González, L., García-Huertas, P., Triana-Chávez, O., García, G. A., Murta, S. M. F., and Mejía-Jaramillo, A. M. (2017). Aldo-keto reductase and alcohol dehydrogenase contribute to benzimidazole natural resistance in *Trypanosoma cruzi*: Benzimidazole natural resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Microbiol.* 106, 704–718. doi:10.1111/mmi.13830.

Hall, B. S., Bot, C., and Wilkinson, S. R. (2011). Nifurtimox Activation by Trypanosomal Type I Nitroreductases Generates Cytotoxic Nitrile Metabolites. *J. Biol. Chem.* 286, 13088–13095. doi:10.1074/jbc.M111.230847.

Jullien, N. (2003). Regulation of Cre recombinase by ligand-induced complementation of inactive fragments. *Nucleic Acids Res.* 31, 131e – 131. doi:10.1093/nar/gng131.

Jullien, N., Goddard, I., Selmi-Ruby, S., Fina, J.-L., Cremer, H., and Herman, J.-P. (2007). Conditional Transgenesis Using Dimerizable Cre (DiCre). *PLoS ONE* 2, e1355. doi:10.1371/journal.pone.0001355.

Kangussu-Marcolino, M. M., Cunha, A. P., Avila, A. R., Herman, J.-P., and DaRocha, W. D. (2014). Conditional removal of selectable markers in *Trypanosoma cruzi* using a site-specific recombination tool: Proof of concept. *Mol. Biochem. Parasitol.* 198, 71–74. doi:10.1016/j.molbiopara.2015.01.001.

Lander, N., Chiurillo, M. A., Storey, M., Vercesi, A. E., and Docampo, R. (2016). CRISPR/Cas9-mediated endogenous C-terminal Tagging of *Trypanosoma cruzi* Genes Reveals the Acidocalcisome Localization of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor. *J. Biol. Chem.* 291, 25505–25515. doi:10.1074/jbc.M116.749655.

Lander, N., Chiurillo, M., Vercesi, A., and Docampo, R. (2017). Endogenous C-terminal Tagging by CRISPR/Cas9 in *Trypanosoma cruzi*. *BIO-Protoc.* 7. doi:10.21769/BioProtoc.2299.

Lander, N., Li, Z.-H., Niyogi, S., and Docampo, R. (2015). CRISPR/Cas9-Induced Disruption of Paraflagellar Rod Protein 1 and 2 Genes in *Trypanosoma cruzi* Reveals Their Role in Flagellar Attachment. *mBio* 6, e01012-15. doi:10.1128/mBio.01012-15.

Lewandoski, M. (2001). MOUSE GENOMIC TECHNOLOGIES: CONDITIONAL CONTROL OF GENE EXPRESSION IN THE MOUSE. *Nat. Rev. Genet.* 2, 743–755. doi:10.1038/35093537.

Loonstra, A., Vooijs, M., Beverloo, H. B., Allak, B. A., van Drunen, E., Kanaar, R., et al. (2001). Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 9209–9214. doi:10.1073/pnas.161269798.

Lorenzi, H. A., Vazquez, M. P., and Levin, M. J. (2003). Integration of expression vectors into the ribosomal locus of *Trypanosoma cruzi*. *Gene* 310, 91–99. doi:10.1016/S0378-1119(03)00502-X.

Marchetti, M. A., Tschudi, C., Kwon, H., Wolin, S. L., and Ullu, E. (2000). Import of proteins into the trypanosome nucleus and their distribution at karyokinesis. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 5), 899–906.

Pacheco-Lugo, L., Díaz-Olmos, Y., Sáenz-García, J., Probst, C. M., and DaRocha, W. D. (2017). Effective gene delivery to *Trypanosoma cruzi* epimastigotes through nucleofection. *Parasitol. Int.* 66, 236–239. doi:10.1016/j.parint.2017.01.019.

Peng, D., Kurup, S. P., Yao, P. Y., Minning, T. A., and Tarleton, R. L. (2015). CRISPR-Cas9-mediated single-gene and gene family disruption in *Trypanosoma cruzi*. *mBio* 6, e02097-02014. doi:10.1128/mBio.02097-14.

Romagnoli, B. A. A., Picchi, G. F. A., Hiraiwa, P. M., Borges, B. S., Alves, L. R., and Goldenberg, S. (2018). Improvements in the CRISPR/Cas9 system for high efficiency gene disruption in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 178, 190–195. doi:10.1016/j.actatropica.2017.11.013.

Santos, R. E. R. S., Silva, G. L. A., Santos, E. V., Duncan, S. M., Mottram, J. C., Damasceno, J. D., et al. (2017). A DiCre recombinase-based system for inducible expression in *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 216, 45–48. doi:10.1016/j.molbiopara.2017.06.006.

Sauer, B. (1998). Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods San Diego Calif* 14, 381–392. doi:10.1006/meth.1998.0593.

Schmidt, E. E., Taylor, D. S., Prigge, J. R., Barnett, S., and Capecchi, M. R. (2000). Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 13702–13707. doi:10.1073/pnas.240471297.

Schumann Burkard, G., Jutzi, P., and Roditi, I. (2011). Genome-wide RNAi screens in bloodstream form trypanosomes identify drug transporters. *Mol. Biochem. Parasitol.* 175, 91–94. doi:10.1016/j.molbiopara.2010.09.002.

Silver, D. P., and Livingston, D. M. (2001). Self-excising retroviral vectors encoding the Cre recombinase overcome Cre-mediated cellular toxicity. *Mol. Cell* 8, 233–243.

Soares Medeiros, L. C., South, L., Peng, D., Bustamante, J. M., Wang, W., Bunkofske, M., et al. (2017). Rapid, Selection-Free, High-Efficiency Genome Editing in Protozoan Parasites Using CRISPR-Cas9 Ribonucleoproteins. *mBio* 8, e01788-17. doi:10.1128/mBio.01788-17.

Song, Y., Yuan, L., Wang, Y., Chen, M., Deng, J., Lv, Q., et al. (2016). Efficient dual sgRNA-directed large gene deletion in rabbit with CRISPR/Cas9 system. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 2959–2968. doi:10.1007/s00018-016-2143-z.

Tang, J. C. Y., Rudolph, S., Dhande, O. S., Abaira, V. E., Choi, S., Lapan, S. W., et al. (2015). Cell type-specific manipulation with GFP-dependent Cre recombinase. *Nat. Neurosci.* 18, 1334–1341. doi:10.1038/nn.4081.

Taylor, M. C., and Kelly, J. M. (2006). pTcINDEX: a stable tetracycline-regulated expression vector for *Trypanosoma cruzi*. *BMC Biotechnol.* 6, 32. doi:10.1186/1472-6750-6-32.

Testa, G., and Stewart, A. F. (2000). Creating a trans location: Engineering interchromosomal translocations in the mouse. *EMBO Rep.* 1, 120–121. doi:10.1093/embo-reports/kvd035.

Wyllie, S., Patterson, S., and Fairlamb, A. H. (2013). Assessing the Essentiality of *Leishmania donovani* Nitroreductase and Its Role in Nitro Drug Activation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 901–906. doi:10.1128/AAC.01788-12.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Neste trabalho objetivou-se desenvolver e aprimorar ferramentas para a manipulação da expressão gênica em *Trypanosoma cruzi* a fim de realizar ensaios que permitam acessar função de genes em larga escala. Os principais pontos abordados nos capítulos apresentados foram: I) Otimização das condições de eletroporação em formas epimastigotas do parasito; II) Idealização e construção de bibliotecas genômicas funcionais de superexpressão de ORFs para identificar genes associados a mecanismos de resistência a drogas; e III) desenvolvimento de um sistema mais versátil de controle da expressão gênica e deleção de sequências por recombinação em qualquer fase do ciclo de vida do parasito utilizando o sistema CRE-*lox*.

No capítulo I, usando o nucleofector (metodologia desenvolvida pela Amaxa) foi possível melhorar a eficiência de transfecção transiente em formas epimastigotas do *T. cruzi*, atingindo porcentagens de transfecção 3 vezes superiores às reportadas usando abordagens convencionais. Além da eficiência, este procedimento trouxe benefícios adicionais, tais como: 1) menor quantidade de DNA utilizado; 2) menor número de células por eletroporação; 3) taxa de viabilidade celular após eletroporação muito superior a métodos convencionais (>90%); e 4) tempo de seleção de parasitos resistentes bem curto (15 dias). É necessário continuar explorando novos protocolos de transfecção que permitam melhorar a transferência de DNA em diferentes formas do ciclo de vida do *T. cruzi*. Baixíssimas eficiências de eletroporação ainda são atingidas em formas não replicativas e/ou infecciosas (PADMANABHAN et al., 2014), o que limita a manipulação específica nesta forma do parasita. Recentemente foi reportado que a sincronização do ciclo celular favorece a eficiência de eletroporação em forma replicativa do *T. cruzi* (OLMO et al., 2018), o que abre um cenário interessante para continuar explorando. Por outro lado, a busca de métodos para facilitar transfecções estáveis, ou seja, promoção de integração são ainda incipientes. Sendo assim é interessante investir em métodos baseados em CRE recombinase, meganuclease, e CRISPR-Cas9 para favorecer formação de quebras ou recombinação sítio-específica.

No Capítulo II, foi reportado pela primeira vez a idealização e construção de bibliotecas de superexpressão para abordagens genômica funcionais em larga escala em *T. cruzi*. A biblioteca foi validada em um protocolo de seleção de parasitas resistentes a benzonidazol, a principal droga usada no tratamento da doença de Chagas. O protocolo permitiu identificar uma *Open Reading Frame*, a RNP-U2, potencialmente associada ao mecanismo de resistência à droga, a pesar que é necessário continuar explorando o papel dessa proteína no mecanismo de resistência. Apesar do sucesso na identificação de um novo gene relacionado a resistência, constatou-se a baixa diversidade de clones na biblioteca, que deverá ser implementada pela utilização de métodos de integração baseado em CRISPR-Cas9 ou CRE recombinase.

O sistema CREditing se mostrou muito eficiente para regular a expressão de genes, independente do contexto genômico. Levando a consideração que houve uma aparente baixa representatividade de clones na população carregando o ORFoma, seria interessante testar o sistema CREditing como uma ferramenta de integração sitio-específica, por exemplo, integrando a biblioteca de ORFs em um *locus* genômico com sítios *lox* previamente integrados. Outro apelo interessante dessa estratégia é que a biblioteca poderia ser integrada de forma invertida (estado OFF) e induzida por meio da eletroporação com CRE recombinase.

Já no capítulo III, por meio de duas diferentes abordagens metodológicas com eficiência distintas, mostramos que é possível regular de forma condicional a expressão de genes repórteres e genes associados a resistência a benzonidazol utilizando a recombinação sitio-específica com a enzima CRE recombinase. O sistema CRE-DOG, atividade de CRE dependente de GFP, mostrou-se pouco eficiente para regular a expressão do gene repórter tdTomato. No entanto, o sistema CREditing, eletroporação direta da proteína recombinante TcNLS::CRE recombinase purificada, mostrou-se muito eficiente para: 1) “ascender” de forma condicional a expressão de genes repórteres e genes associados a resistência a benzonidazol, 2) “apagar” de forma condicional a expressão do gene repórter GFP, 3) deletar sequências integradas no *locus* genômico da beta-tubulina, e 4) manipular formas infectivas (TCTs) do parasita. Estes dados reportados nessa sessão indicam que o sistema CREditing

poderá ser usado para expressão e/ou deleção de forma condicional genes endógenos do *T. cruzi* em diferentes fases do ciclo de vida do parasito.

O passo seguinte será mostrar que é possível inverter ou deletar genes endógenos, que precisará ser flanqueado por sítios *lox* (o sitio selvagem *loxP* ou variantes dele). O sistema CRISPR-Cas9 já mostrou ser uma ferramenta muito eficiente para gerar quebras sítio-específicas no genoma do *T. cruzi*, então ela poderá ser usada para integrar tais sítios *lox* em diferentes regiões do genoma do parasita usando como DNA doador as sequências *lox*.

Uma das limitações da abordagem de recombinação reportada aqui é o seguimento das populações que foram recombinadas, quando se está analisando um gene que naturalmente não floresce, como foi o caso dos genes NTR e AKR. Neste momento estamos trabalhando no desenvolvendo de um sistema de expressão bicistrônico que permitirá resolver esse inconveniente. Nesse sistema, o primeiro gene é o repórter fluorescente tdTomato quem está flanqueado por sítios *LoxP*. O segundo gene pode ser qualquer gene sob estudo, que na ausência de recombinação não será expresso. Após transfecção da CRE recombinase, o gene fluorescente é deletado com a consequente perda de fluorescência da população e expressão do segundo gene. Nesse cenário, o fenótipo sob estudo pode ser analisado de forma específica na população tdTomato negativa.

Esses avanços reportados, coletivamente, apontam para um horizonte que torna a engenharia genéticas destes organismos menos laboriosa e mais atrativa. Desta forma, a genômica funcional poderá promover maiores avanços no entendimento de diversas situações como: resistência a droga, mecanismos de virulência, diferenciação, crescimento, motilidade, regulação da expressão.

REFERÊNCIAS

ALSFORD, S. et al. **High-throughput phenotyping using parallel sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome.** *Genome Research*, [s.l.], v. 21, n° 6, p. 915–924, 2011. ISSN: 1549-5469, DOI: 10.1101/gr.115089.110.

_____. **High-throughput decoding of antitrypanosomal drug efficacy and resistance.** *Nature*, [s.l.], v. 482, n° 7384, p. 232–236, 2012. ISSN: 1476-4687, DOI: 10.1038/nature10771.

_____. **Genetic dissection of drug resistance in trypanosomes.** *Parasitology*, [s.l.], v. 140, n° 12, p. 1478–1491, 2013. ISSN: 0031-1820, 1469-8161, DOI: 10.1017/S003118201300022X.

ANDRADE, H. M. et al. **Proteomic Analysis of Trypanosoma cruzi Resistance to Benznidazole.** *Journal of Proteome Research*, [s.l.], v. 7, n° 6, p. 2357–2367, 2008. ISSN: 1535-3893, 1535-3907, DOI: 10.1021/pr700659m.

ASLETT, M. et al. **TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae.** *Nucleic Acids Research*, [s.l.], v. 38, n° suppl_1, p. D457–D462, 2010. ISSN: 0305-1048, 1362-4962, DOI: 10.1093/nar/gkp851.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. et al. **Immunological and Clinical Evaluation of Chagasic Patients Subjected to Chemotherapy during the Acute Phase of Trypanosoma cruzi Infection 14–30 Years Ago.** *The Journal of Infectious Diseases*, [s.l.], v. 182, n° 2, p. 634–638, 2000. ISSN: 0022-1899, 1537-6613, DOI: 10.1086/315743.

BARBOSA-FERREIRA, J. M. et al. **[Cardiac involvement in Acute Chagas' Disease cases in the Amazon region].** *Arquivos Brasileiros De Cardiologia*, [s.l.], v. 94, n° 6, p. 147–149, 2010. ISSN: 1678-4170.

BATISTA, J. A. et al. **Characterization of a Trypanosoma cruzi poly(A)-binding protein and its genes.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, [s.l.], v. 67, n° 2, p. 301–312, 1994. ISSN: 0166-6851.

BATISTA, M. et al. **A high-throughput cloning system for reverse genetics in Trypanosoma cruzi.** *BMC Microbiology*, [s.l.], v. 10, n° 1, p. 259, 2010. ISSN: 1471-2180, DOI: 10.1186/1471-2180-10-259.

BEGOLO, D.; ERBEN, E.; CLAYTON, C. **Drug Target Identification Using a Trypanosome Overexpression Library.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [s.l.], v. 58, n° 10, p. 6260–6264, 2014. ISSN: 0066-4804, 1098-6596, DOI: 10.1128/AAC.03338-14.

BENCHIMOL BARBOSA, P. R. **The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks.** *International Journal of Cardiology*, [s.l.], v. 112, n° 1, p. 132–133, 2006. ISSN: 0167-5273, DOI: 10.1016/j.ijcard.2005.11.087.

BERMUDEZ, J. et al. **Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease.** *Acta Tropica*, [s.l.], v. 156, p. 1–16, 2016. ISSN: 0001706X, DOI: 10.1016/j.actatropica.2015.12.017.

BERNÁ, L. et al. **Expanding an expanded genome: long-read sequencing of Trypanosoma cruzi.** *Microbial Genomics*, [s.l.], v. 4, n° 5, 2018. ISSN: 2057-5858, DOI: 10.1099/mgen.0.000177.

BETHKE, B.; SAUER, B. **Segmental genomic replacement by Cre-mediated recombination: genotoxic stress activation of the p53 promoter in single-copy transformants.** *Nucleic Acids Research*, [s.l.], v. 25, n° 14, p. 2828–2834, 1997. ISSN: 0305-1048.

BURLE-CALDAS, G. A. et al. **Assessment of two CRISPR-Cas9 genome editing protocols for rapid generation of Trypanosoma cruzi gene knockout mutants.** *International Journal for Parasitology*, [s.l.], v. 48, n° 8, p. 591–596, 2018. ISSN: 00207519, DOI: 10.1016/j.ijpara.2018.02.002.

BURLE-CALDAS, G. de A. et al. **Expanding the tool box for genetic manipulation of Trypanosoma cruzi.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, [s.l.], v. 203, n° 1–2, p. 25–33, 2015. ISSN: 01666851, DOI: 10.1016/j.molbiopara.2015.10.004.

BUSTAMANTE, J. M. et al. **New, Combined, and Reduced Dosing Treatment Protocols Cure Trypanosoma cruzi Infection in Mice.** *Journal of Infectious Diseases*, [s.l.], v. 209, n° 1, p. 150–162, 2014. ISSN: 0022-1899, 1537-6613, DOI: 10.1093/infdis/jit420.

CAMPOS, F. M. F. et al. **Characterization of a gene encoding alcohol dehydrogenase in benzimidazole-susceptible and -resistant populations of Trypanosoma cruzi.** *Acta Tropica*, [s.l.], v. 111, n° 1, p. 56–63, 2009. ISSN: 0001706X, DOI: 10.1016/j.actatropica.2009.02.007.

CAMPOS, M. C. et al. **Genome-wide mutagenesis and multi-drug resistance in American trypanosomes induced by the front-line drug benznidazole.** *Scientific Reports*, [s.l.], v. 7, n° 1, 2017. ISSN: 2045-2322, DOI: 10.1038/s41598-017-14986-6.

CAMPOS, P. C. et al. **Sequences involved in mRNA processing in *Trypanosoma cruzi*.** *International Journal for Parasitology*, [s.l.], v. 38, n° 12, p. 1383–1389, 2008. ISSN: 00207519, DOI: 10.1016/j.ijpara.2008.07.001.

CANCADO, J. R. **Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole.** *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo*, [s.l.], v. 44, n° 1, p. 29–37, 2002. ISSN: 0036-4665.

CARTER, N. S. et al. **Cloning of a Novel Inosine-Guanosine Transporter Gene from *Leishmania donovani* by Functional Rescue of a Transport-deficient Mutant.** *Journal of Biological Chemistry*, [s.l.], v. 275, n° 27, p. 20935–20941, 2000. ISSN: 0021-9258, 1083-351X, DOI: 10.1074/jbc.M002418200.

CLAYTON, J. **Chagas disease 101.** *Nature*, [s.l.], v. 465, n° n7301_suppl, p. S4–S5, 2010. ISSN: 0028-0836, 1476-4687, DOI: 10.1038/nature09220.

COSTA, F. C. et al. **Expanding the toolbox for *Trypanosoma cruzi*: A parasite line incorporating a bioluminescence-fluorescence dual reporter and streamlined CRISPR/Cas9 functionality for rapid in vivo localisation and phenotyping.** *PLOS Neglected Tropical Diseases*, [s.l.], v. 12, n° 4, p. e0006388, 2018. ISSN: 1935-2735, DOI: 10.1371/journal.pntd.0006388.

COTRIM, P. C.; GARRITY, L. K.; BEVERLEY, S. M. **Isolation of Genes Mediating Resistance to Inhibitors of Nucleoside and Ergosterol Metabolism in *Leishmania* by Overexpression/Selection.** *Journal of Biological Chemistry*, [s.l.], v. 274, n° 53, p. 37723–37730, 1999. ISSN: 0021-9258, 1083-351X, DOI: 10.1074/jbc.274.53.37723.

COURA, J. R. et al. **[Comparative controlled study on the use of benznidazole, nifurtimox and placebo, in the chronic form of Chagas' disease, in a field area with interrupted transmission. I. Preliminary evaluation].** *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, [s.l.], v. 30, n° 2, p. 139–144, 1997. ISSN: 0037-8682.

COURA, José Rodrigues; CASTRO, S. L. De. **A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, [s.l.], v. 97, n° 1, p. 3–24, 2002. ISSN: 0074-0276, DOI: 10.1590/S0074-02762002000100001.

COURA, José Rodrigues; VIÑAS, P. A. **Chagas disease: a new worldwide challenge.** *Nature*, [s.l.], v. 465, n° n7301_suppl, p. S6–S7, 2010. ISSN: 0028-0836, 1476-4687, DOI: 10.1038/nature09221.

CRIBB, P. et al. **Spliced leader RNA gene promoter sequence heterogeneity in CL-Brener *Trypanosoma cruzi* reference strain.** *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, [s.l.], v. 4, n° 2, p. 153–157, 2004. ISSN: 1567-1348, DOI: 10.1016/j.meegid.2004.02.002.

CRIBB, P.; SERRA, E. **One- and two-hybrid analysis of the interactions between components of the *Trypanosoma cruzi* spliced leader RNA gene promoter binding complex.** *International Journal for Parasitology*, [s.l.], v. 39, n° 5, p. 525–532, 2009. ISSN: 1879-0135, DOI: 10.1016/j.ijpara.2008.09.008.

DAMASCENO, J. D. et al. **Conditional genome engineering reveals canonical and divergent roles for the Hus1 component of the 9–1–1 complex in the maintenance of the plastic genome of *Leishmania*.** *Nucleic Acids Research*, [s.l.], v. 46, n° 22, p. 11835–11846, 2018. ISSN: 0305-1048, 1362-4962, DOI: 10.1093/nar/gky1017.

DAROCHA, W. D.; SILVA, R. A. et al. **Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi* : improving vectors and electroporation protocols.** *Parasitology Research*, [s.l.], v. 92, n° 2, p. 113–120, 2004. ISSN: 0932-0113, 1432-1955, DOI: 10.1007/s00436-003-1004-5.

DAROCHA, W. D.; OTSU, K. et al. **Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, [s.l.], v. 133, n° 2, p. 175–186, 2004. ISSN: 0166-6851.

DE GAUDENZI, J.; FRASCH, A. C.; CLAYTON, C. **RNA-Binding Domain Proteins in Kinetoplastids: a Comparative Analysis.** *Eukaryotic Cell*, [s.l.], v. 4, n° 12, p. 2106–2114, 2005. ISSN: 1535-9778, 1535-9786, DOI: 10.1128/EC.4.12.2106-2114.2005.

DIAS, J. P. et al. **Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission.** *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, [s.l.], v. 41, n° 3, p. 296–300, 2008. ISSN: 0037-8682.

DINIZ, L. de F. et al. **Benznidazole and Posaconazole in Experimental Chagas Disease: Positive Interaction in Concomitant and Sequential Treatments.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, [s.l.], v. 7, n° 8, p. e2367, 2013. ISSN: 1935-2735, DOI: 10.1371/journal.pntd.0002367.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. **Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi***. *Reviews of Infectious Diseases*, [s.l.], v. 6, n° 2, p. 223–238, 1984. ISSN: 0162-0886.

D'ORSO, I.; FRASCH, A. C. C. **TcUBP-1, a Developmentally Regulated U-rich RNA-binding Protein Involved in Selective mRNA Destabilization in Trypanosomes**. *Journal of Biological Chemistry*, [s.l.], v. 276, n° 37, p. 34801–34809, 2001. ISSN: 0021-9258, 1083-351X, DOI: 10.1074/jbc.M102120200.

_____. **TcUBP-1, an mRNA Destabilizing Factor from Trypanosomes, Homodimerizes and Interacts with Novel AU-rich Element- and Poly(A)-binding Proteins Forming a Ribonucleoprotein Complex**. *Journal of Biological Chemistry*, [s.l.], v. 277, n° 52, p. 50520–50528, 2002. ISSN: 0021-9258, 1083-351X, DOI: 10.1074/jbc.M209092200.

DUNCAN, S. M. et al. **Conditional gene deletion with DiCre demonstrates an essential role for CRK3 in *Leishmania mexicana* cell cycle regulation: Conditional gene deletion in *Leishmania***. *Molecular Microbiology*, [s.l.], p. n/a-n/a, 2016. ISSN: 0950382X, DOI: 10.1111/mmi.13375.

EL-SAYED, N. M. **The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease**. *Science*, [s.l.], v. 309, n° 5733, p. 409–415, 2005. ISSN: 0036-8075, 1095-9203, DOI: 10.1126/science.1112631.

FERREIRA, C. S. et al. **Pasteurization of human milk to prevent transmission of Chagas disease**. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo*, [s.l.], v. 43, n° 3, p. 161–162, 2001. ISSN: 0036-4665.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. **Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease**. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, [s.l.], v. 81, n° 5, p. 755–759, 1987. ISSN: 0035-9203.

FÖRCH, P.; VALCÁRCEL, J. **Molecular mechanisms of gene expression regulation by the apoptosis-promoting protein TIA-1**. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, [s.l.], v. 6, n° 6, p. 463–468, 2001. ISSN: 1360-8185.

FRANZÉN, O. et al. **Shotgun sequencing analysis of *Trypanosoma cruzi* I Sylvio X10/1 and comparison with *T. cruzi* VI CL Brener**. *PLoS neglected tropical diseases*, [s.l.], v. 5, n° 3, p. e984, 2011. ISSN: 1935-2735, DOI: 10.1371/journal.pntd.0000984.

_____. **Comparative genomic analysis of human infective *Trypanosoma cruzi* lineages with the bat-restricted subspecies *T. cruzi marinkellei*.** *BMC Genomics*, [s.l.], v. 13, n° 1, p. 531, 2012. ISSN: 1471-2164, DOI: 10.1186/1471-2164-13-531.

GHOSH, K.; VAN DUYN, G. D. **Cre-loxP biochemistry.** *Methods*, [s.l.], v. 28, n° 3, p. 374–383, 2002. ISSN: 10462023, DOI: 10.1016/S1046-2023(02)00244-X.

GLOVER, L.; HORN, D. **Site-specific DNA double-strand breaks greatly increase stable transformation efficiency in *Trypanosoma brucei*.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, [s.l.], v. 166, n° 2, p. 194–197, 2009. ISSN: 01666851, DOI: 10.1016/j.molbiopara.2009.03.010.

GOAD, L. J.; HOLZ, G. G.; BEACH, D. H. **Sterols of *Leishmania* species. Implications for biosynthesis.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, [s.l.], v. 10, n° 2, p. 161–170, 1984. ISSN: 0166-6851.

GONZÁLEZ, L. et al. **Aldo-keto reductase and alcohol dehydrogenase contribute to benznidazole natural resistance in *Trypanosoma cruzi*: Benznidazole natural resistance in *Trypanosoma cruzi*.** *Molecular Microbiology*, [s.l.], v. 106, n° 5, p. 704–718, 2017. ISSN: 0950382X, DOI: 10.1111/mmi.13830.

GRISARD, E. C. et al. ***Trypanosoma cruzi* Clone Dm28c Draft Genome Sequence.** *Genome Announcements*, [s.l.], v. 2, n° 1, 2014. ISSN: 2169-8287, DOI: 10.1128/genomeA.01114-13.

HALL, B. S.; BOT, C.; WILKINSON, S. R. **Nifurtimox Activation by Trypanosomal Type I Nitroreductases Generates Cytotoxic Nitrile Metabolites.** *Journal of Biological Chemistry*, [s.l.], v. 286, n° 15, p. 13088–13095, 2011. ISSN: 0021-9258, 1083-351X, DOI: 10.1074/jbc.M111.230847.

HALL, B. S.; WILKINSON, S. R. **Activation of Benznidazole by Trypanosomal Type I Nitroreductases Results in Glyoxal Formation.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [s.l.], v. 56, n° 1, p. 115–123, 2012. ISSN: 0066-4804, 1098-6596, DOI: 10.1128/AAC.05135-11.

HANNON, G. J. **RNA interference.** *Nature*, [s.l.], v. 418, n° 6894, p. 244–251, 2002. ISSN: 0028-0836, 1476-4687, DOI: 10.1038/418244a.

ITO, M. et al. **Genome-wide application of RNAi to the discovery of potential drug targets.** *FEBS Letters*, [s.l.], v. 579, n° 26, p. 5988–5995, 2005. ISSN: 00145793, DOI: 10.1016/j.febslet.2005.08.015.

IVENS, A. C. **The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*.** *Science*, [s.l.], v. 309, n° 5733, p. 436–442, 2005. ISSN: 0036-8075, 1095-9203, DOI: 10.1126/science.1112680.

KANGUSSU-MARCOLINO, M. M. et al. **Conditional removal of selectable markers in *Trypanosoma cruzi* using a site-specific recombination tool: Proof of concept.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, [s.l.], v. 198, n° 2, p. 71–74, 2014. ISSN: 01666851, DOI: 10.1016/j.molbiopara.2015.01.001.

KELLY, J. M. et al. **A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*.** *Nucleic Acids Research*, [s.l.], v. 20, n° 15, p. 3963–3969, 1992. ISSN: 0305-1048, 1362-4962, DOI: 10.1093/nar/20.15.3963.

KOLEV, N. G. et al. **The transcriptome of the human pathogen *Trypanosoma brucei* at single-nucleotide resolution.** *PLoS pathogens*, [s.l.], v. 6, n° 9, p. e1001090, 2010. ISSN: 1553-7374, DOI: 10.1371/journal.ppat.1001090.

KUBATA, B. K. et al. **A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by *Trypanosoma cruzi*.** *The Journal of Experimental Medicine*, [s.l.], v. 196, n° 9, p. 1241–1251, 2002. ISSN: 0022-1007.

KUGERATSKI, F. G. et al. **pTcGW plasmid vectors 1.1 version: a versatile tool for *Trypanosoma cruzi* gene characterisation.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, [s.l.], v. 110, n° 5, p. 687–690, 2015. ISSN: 1678-8060, DOI: 10.1590/0074-02760150074.

LANDER, N. et al. **CRISPR/Cas9-Induced Disruption of Paraflagellar Rod Protein 1 and 2 Genes in *Trypanosoma cruzi* Reveals Their Role in Flagellar Attachment.** *mBio*, [s.l.], v. 6, n° 4, p. e01012-15, 2015a. ISSN: 2150-7511, DOI: 10.1128/mBio.01012-15.

_____. **CRISPR/Cas9-Induced Disruption of Paraflagellar Rod Protein 1 and 2 Genes in *Trypanosoma cruzi* Reveals Their Role in Flagellar Attachment.** *mBio*, [s.l.], v. 6, n° 4, p. e01012-15, 2015b. ISSN: 2150-7511, DOI: 10.1128/mBio.01012-15.

LANZA, A. M.; DYESS, T. J.; ALPER, H. S. **Using the Cre/lox system for targeted integration into the human genome: loxFAS-loxP pairing and delayed introduction of**

Cre DNA improve gene swapping efficiency. *Biotechnology Journal*, [s.l.], v. 7, n° 7, p. 898–908, 2012. ISSN: 18606768, DOI: 10.1002/biot.201200034.

LORENZI, H. A.; VAZQUEZ, M. P.; LEVIN, M. J. **Integration of expression vectors into the ribosomal locus of *Trypanosoma cruzi*.** *Gene*, [s.l.], v. 310, p. 91–99, 2003. ISSN: 03781119, DOI: 10.1016/S0378-1119(03)00502-X.

MARIS, C.; DOMINGUEZ, C.; ALLAIN, F. H.-T. **The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression: The RRM domain, a plastic RNA-binding platform.** *FEBS Journal*, [s.l.], v. 272, n° 9, p. 2118–2131, 2005. ISSN: 1742464X, 17424658, DOI: 10.1111/j.1742-4658.2005.04653.x.

MARQUIS, N. et al. **Modulation in aquaglyceroporin *AQP1* gene transcript levels in drug-resistant *Leishmania*: *AQP1* and drug resistance in *Leishmania*.** *Molecular Microbiology*, [s.l.], v. 57, n° 6, p. 1690–1699, 2005. ISSN: 0950382X, DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04782.x.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S. et al. **Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region.** *Molecular Cell*, [s.l.], v. 11, n° 5, p. 1291–1299, 2003. ISSN: 1097-2765.

_____. **Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3.** *Eukaryotic Cell*, [s.l.], v. 3, n° 2, p. 506–517, 2004. ISSN: 1535-9778.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; LÓPEZ, I.; HERNÁNDEZ, R. **pRIBOTEX expression vector: a pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants.** *Gene*, [s.l.], v. 199, n° 1–2, p. 71–76, 1997. ISSN: 03781119, DOI: 10.1016/S0378-1119(97)00348-X.

MAYA, J. D. et al. **Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, [s.l.], v. 146, n° 4, p. 601–620, 2007. ISSN: 10956433, DOI: 10.1016/j.cbpa.2006.03.004.

MEJIA, A. M. et al. **Benznidazole-Resistance in *Trypanosoma cruzi* Is a Readily Acquired Trait That Can Arise Independently in a Single Population.** *The Journal of Infectious Diseases*, [s.l.], v. 206, n° 2, p. 220–228, 2012. ISSN: 1537-6613, 0022-1899, DOI: 10.1093/infdis/jis331.

MEJÍA-JARAMILLO, A. M. et al. **Gene expression study using real-time PCR identifies an NTR gene as a major marker of resistance to benznidazole in *Trypanosoma cruzi*.** *Parasites & Vectors*, [s.l.], v. 4, n° 1, p. 169, 2011. ISSN: 1756-3305, DOI: 10.1186/1756-3305-4-169.

MICHAELI, S. **Trans-splicing in trypanosomes: machinery and its impact on the parasite transcriptome.** *Future Microbiology*, [s.l.], v. 6, n° 4, p. 459–474, 2011. ISSN: 1746-0921, DOI: 10.2217/fmb.11.20.

MURTA, S. M. F. et al. **Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, [s.l.], v. 146, n° 2, p. 151–162, 2006. ISSN: 01666851, DOI: 10.1016/j.molbiopara.2005.12.001.

MURTA, S. M. F. et al. **Differential gene expression in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole.** *Acta Tropica*, [s.l.], v. 107, n° 1, p. 59–65, 2008. ISSN: 0001-706X, DOI: 10.1016/j.actatropica.2008.04.011.

MURTA, S. M.; ROMANHA, A. J. **In vivo selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole.** *Parasitology*, [s.l.], v. 116 (Pt 2), p. 165–171, 1998. ISSN: 0031-1820.

NIRDÉ, P.; LARROQUE, C.; BARNABÉ, C. **Drug-resistant epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* and persistence of this phenotype after differentiation into amastigotes.** *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie*, [s.l.], v. 318, n° 12, p. 1239–1244, 1995. ISSN: 0764-4469.

NOGUEIRA, Fernanda B. et al. **Increased expression of iron-containing superoxide dismutase-A (TcFeSOD-A) enzyme in *Trypanosoma cruzi* population with in vitro-induced resistance to benznidazole.** *Acta Tropica*, [s.l.], v. 100, n° 1–2, p. 119–132, 2006. ISSN: 0001706X, DOI: 10.1016/j.actatropica.2006.10.004.

_____. **Molecular characterization of cytosolic and mitochondrial tryparedoxin peroxidase in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole.** *Parasitology Research*, [s.l.], v. 104, n° 4, p. 835–844, 2009. ISSN: 0932-0113, 1432-1955, DOI: 10.1007/s00436-008-1264-1.

NOGUEIRA, Fernanda Barbosa et al. **The level of ascorbate peroxidase is enhanced in benznidazole-resistant populations of *Trypanosoma cruzi* and its expression is modulated by stress generated by hydrogen peroxide.** *Memórias do Instituto Oswaldo*

Cruz, [s.l.], v. 107, n° 4, p. 494–502, 2012. ISSN: 0074-0276, DOI: 10.1590/S0074-02762012000400009.

NOIMAN, T.; KAHANA, C. **A Simple Combined Use of CRISPR-Cas9 and Cre-LoxP Technologies for Generating Conditional Gene Knockouts in Mammalian Cells.** *The CRISPR Journal*, [s.l.], v. 1, n° 4, p. 278–285, 2018. ISSN: 2573-1599, 2573-1602, DOI: 10.1089/crispr.2018.0010.

OLMO, F. et al. **Optimising genetic transformation of Trypanosoma cruzi using hydroxyurea-induced cell-cycle synchronisation.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, [s.l.], v. 226, p. 34–36, 2018. ISSN: 01666851, DOI: 10.1016/j.molbiopara.2018.07.002.

OSTERWALDER, M. et al. **Dual RMCE for efficient re-engineering of mouse mutant alleles.** *Nature Methods*, [s.l.], v. 7, n° 11, p. 893–895, 2010. ISSN: 1548-7091, 1548-7105, DOI: 10.1038/nmeth.1521.

PACHECO-LUGO, L. et al. **Effective gene delivery to Trypanosoma cruzi epimastigotes through nucleofection.** *Parasitology International*, [s.l.], v. 66, n° 3, p. 236–239, 2017. ISSN: 13835769, DOI: 10.1016/j.parint.2017.01.019.

PADMANABHAN, P. K. et al. **Transient transfection and expression of foreign and endogenous genes in the intracellular stages of Trypanosoma cruzi.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, [s.l.], v. 198, n° 2, p. 100–103, 2014. ISSN: 01666851, DOI: 10.1016/j.molbiopara.2015.02.001.

PEDRIQUE, B. et al. **The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000–11): a systematic assessment.** *The Lancet Global Health*, [s.l.], v. 1, n° 6, p. e371–e379, 2013. ISSN: 2214109X, DOI: 10.1016/S2214-109X(13)70078-0.

PENG, D. et al. **CRISPR-Cas9-mediated single-gene and gene family disruption in Trypanosoma cruzi.** *mBio*, [s.l.], v. 6, n° 1, p. e02097-02014, 2015a. ISSN: 2150-7511, DOI: 10.1128/mBio.02097-14.

PEREIRA, K. S. et al. **Chagas' disease as a foodborne illness.** *Journal of Food Protection*, [s.l.], v. 72, n° 2, p. 441–446, 2009. ISSN: 0362-028X.

PÉREZ-DÍAZ, L. et al. **The overexpression of the trypanosomatid-exclusive TcRBP19 RNA-binding protein affects cellular infection by Trypanosoma cruzi.** *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, [s.l.], v. 107, n° 8, p. 1076–1079, 2012. ISSN: 1678-8060.

_____. **Evidence for a negative feedback control mediated by the 3' untranslated region assuring the low expression level of the RNA binding protein TcRBP19 in *T. cruzi* epimastigotes.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, [s.l.], v. 436, n° 2, p. 295–299, 2013. ISSN: 0006291X, DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.05.096.

PEREZ-VICTORIA, F. J. et al. **Functional Cloning of the Miltefosine Transporter: A NOVEL P-TYPE PHOSPHOLIPID TRANSLOCASE FROM LEISHMANIA INVOLVED IN DRUG RESISTANCE.** *Journal of Biological Chemistry*, [s.l.], v. 278, n° 50, p. 49965–49971, 2003. ISSN: 0021-9258, 1083-351X, DOI: 10.1074/jbc.M308352200.

PRICE, H. P. et al. **Myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase depletion in trypanosomes causes avirulence and endocytic defects.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, [s.l.], v. 169, n° 1, p. 55–58, 2010. ISSN: 01666851, DOI: 10.1016/j.molbiopara.2009.09.006.

RAJÃO, M. A. et al. **Unveiling Benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in *Trypanosoma cruzi*: Unveiling Benznidazole's Mechanism.** *Environmental and Molecular Mutagenesis*, [s.l.], v. 55, n° 4, p. 309–321, 2014. ISSN: 08936692, DOI: 10.1002/em.21839.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. **Chagas disease.** *The Lancet*, [s.l.], v. 375, n° 9723, p. 1388–1402, 2010. ISSN: 01406736, DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X.

REGO, J. V. et al. ***Trypanosoma cruzi*: Characterisation of the gene encoding tyrosine aminotransferase in benznidazole-resistant and susceptible populations.** *Experimental Parasitology*, [s.l.], v. 118, n° 1, p. 111–117, 2008. ISSN: 00144894, DOI: 10.1016/j.exppara.2007.05.013.

RÊGO, J. V. et al. **Molecular characterization of Cyclophilin (TcCyP19) in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole.** *Experimental Parasitology*, [s.l.], v. 148, p. 73–80, 2015. ISSN: 00144894, DOI: 10.1016/j.exppara.2014.11.007.

ROBINSON, K. A.; BEVERLEY, S. M. **Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, [s.l.], v. 128, n° 2, p. 217–228, 2003. ISSN: 01666851, DOI: 10.1016/S0166-6851(03)00079-3.

ROJO, G. et al. **Toxic and therapeutic effects of Nifurtimox and Benznidazol on *Trypanosoma cruzi* ex vivo infection of human placental chorionic villi explants.** *Acta*

Tropica, [s.l.], v. 132, p. 112–118, 2014. ISSN: 0001706X, DOI: 10.1016/j.actatropica.2014.01.002.

ROMAGNOLI, B. A. A. et al. **Improvements in the CRISPR/Cas9 system for high efficiency gene disruption in *Trypanosoma cruzi***. *Acta Tropica*, [s.l.], v. 178, p. 190–195, 2018. ISSN: 0001706X, DOI: 10.1016/j.actatropica.2017.11.013.

ROMANHA, A. J. et al. **Experimental Chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* Infection: Essential Role of Endogenous Interferon- γ in Mediating Parasitologic Cure**. *The Journal of Infectious Diseases*, [s.l.], v. 186, n^o 6, p. 823–828, 2002. ISSN: 0022-1899, 1537-6613, DOI: 10.1086/342415.

SÁNCHEZ, L. V.; RAMÍREZ, J. D. **Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: an overview of physiopathogenic aspects**. *Parasitology*, [s.l.], v. 140, n^o 2, p. 147–159, 2013. ISSN: 1469-8161, DOI: 10.1017/S0031182012001394.

SANTOS, R. E. R. S. et al. **A DiCre recombinase-based system for inducible expression in *Leishmania major***. *Molecular and Biochemical Parasitology*, [s.l.], v. 216, p. 45–48, 2017. ISSN: 01666851, DOI: 10.1016/j.molbiopara.2017.06.006.

SEC DE VIG EM SAÚDE-MS. **Boletim eletrônico epidemiológico: Situação epidemiológica das zoonoses de interesse para a saúde pública**. [s.l.]: [s.n.], 2010.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. **Oral transmission of Chagas disease**. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, [s.l.], v. 54, n^o 6, p. 845–852, 2012. ISSN: 1537-6591, DOI: 10.1093/cid/cir956.

SOARES MEDEIROS, L. C. et al. **Rapid, Selection-Free, High-Efficiency Genome Editing in Protozoan Parasites Using CRISPR-Cas9 Ribonucleoproteins**. *mBio*, [s.l.], v. 8, n^o 6, p. e01788-17, 2017. ISSN: 2150-7511, DOI: 10.1128/mBio.01788-17.

SOSA-ESTANI, S.; COLANTONIO, L.; SEGURA, E. L. **Therapy of Chagas Disease: Implications for Levels of Prevention**. *Journal of Tropical Medicine*, [s.l.], v. 2012, p. 1–10, 2012. ISSN: 1687-9686, 1687-9694, DOI: 10.1155/2012/292138.

STARK, G. R. **Forward genetics in mammalian cells: functional approaches to gene discovery**. *Human Molecular Genetics*, [s.l.], v. 8, n^o 10, p. 1925–1938, 1999. ISSN: 14602083, DOI: 10.1093/hmg/8.10.1925.

STUART, K. et al. **Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases.** *Journal of Clinical Investigation*, [s.l.], v. 118, n° 4, p. 1301–1310, 2008. ISSN: 0021-9738, DOI: 10.1172/JCI33945.

TAYLOR, M. C.; KELLY, J. M. **pTcINDEX: a stable tetracycline-regulated expression vector for Trypanosoma cruzi.** *BMC biotechnology*, [s.l.], v. 6, p. 32, 2006. ISSN: 1472-6750, DOI: 10.1186/1472-6750-6-32.

TEIXEIRA, S. M. et al. **Trypanosomatid comparative genomics: contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases.** *Genetics and Molecular Biology*, [s.l.], v. 35, n° 1, p. 1–17, 2012. ISSN: 1678-4685, 1415-4757, DOI: 10.1590/S1415-47572012005000008.

TOSO M, A.; VIAL U, F.; GALANTI, N. **[Oral transmission of Chagas' disease].** *Revista Medica De Chile*, [s.l.], v. 139, n° 2, p. 258–266, 2011. ISSN: 0717-6163, DOI: /S0034-98872011000200017.

URBINA, J. A. **Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches.** *Acta Tropica*, [s.l.], v. 115, n° 1–2, p. 55–68, 2010. ISSN: 0001706X, DOI: 10.1016/j.actatropica.2009.10.023.

VASUDEVAN, G.; ULLMAN, B.; LANDFEAR, S. M. **Point mutations in a nucleoside transporter gene from Leishmania donovani confer drug resistance and alter substrate selectivity.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [s.l.], v. 98, n° 11, p. 6092–6097, 2001. ISSN: 0027-8424, 1091-6490, DOI: 10.1073/pnas.101537298.

VAZQUEZ, M. P.; LEVIN, M. J. **Functional analysis of the intergenic regions of TcP2beta gene loci allowed the construction of an improved Trypanosoma cruzi expression vector.** *Gene*, [s.l.], v. 239, n° 2, p. 217–225, 1999. ISSN: 0378-1119.

VILLARREAL, D. et al. **Differential Gene Expression in Benznidazole-Resistant Trypanosoma cruzi Parasites.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [s.l.], v. 49, n° 7, p. 2701–2709, 2005. ISSN: 0066-4804, 1098-6596, DOI: 10.1128/AAC.49.7.2701-2709.2005.

VIOTTI, R. et al. **Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities.** *Expert Review of Anti-infective Therapy*, [s.l.], v. 7, n° 2, p. 157–163, 2009. ISSN: 1478-7210, 1744-8336, DOI: 10.1586/14787210.7.2.157.

VOAK, A. A. et al. **An Essential Type I Nitroreductase from *Leishmania major* Can Be Used to Activate Leishmanicidal Prodrugs.** *Journal of Biological Chemistry*, [s.l.], v. 288, n° 40, p. 28466–28476, 2013. ISSN: 0021-9258, 1083-351X, DOI: 10.1074/jbc.M113.494781.

WEATHERLY, D. B.; BOEHLKE, C.; TARLETON, R. L. **Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome.** *BMC genomics*, [s.l.], v. 10, p. 255, 2009. ISSN: 1471-2164, DOI: 10.1186/1471-2164-10-255.

WILKINSON, S. R. et al. **A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [s.l.], v. 105, n° 13, p. 5022–5027, 2008. ISSN: 0027-8424, 1091-6490, DOI: 10.1073/pnas.0711014105.

WILKINSON, S. R.; KELLY, J. M. **Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets.** *Expert Reviews in Molecular Medicine*, [s.l.], v. 11, 2009. ISSN: 1462-3994, DOI: 10.1017/S1462399409001252.

WILL, C. L.; LUHRMANN, R. **Spliceosome Structure and Function.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, [s.l.], v. 3, n° 7, p. a003707–a003707, 2011. ISSN: 1943-0264, DOI: 10.1101/cshperspect.a003707.

WYLLIE, S. et al. **The Anti-Trypanosome Drug Fexinidazole Shows Potential for Treating Visceral Leishmaniasis.** *Science Translational Medicine*, [s.l.], v. 4, n° 119, p. 119re1-119re1, 2012. ISSN: 1946-6234, 1946-6242, DOI: 10.1126/scitranslmed.3003326.

WYLLIE, S.; PATTERSON, S.; FAIRLAMB, A. H. **Assessing the Essentiality of *Leishmania donovani* Nitroreductase and Its Role in Nitro Drug Activation.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [s.l.], v. 57, n° 2, p. 901–906, 2013. ISSN: 0066-4804, 1098-6596, DOI: 10.1128/AAC.01788-12.

XU, D. et al. **Evaluation of high efficiency gene knockout strategies for *Trypanosoma cruzi*.** *BMC microbiology*, [s.l.], v. 9, p. 90, 2009. ISSN: 1471-2180, DOI: 10.1186/1471-2180-9-90.

YANG, F. et al. **CRISPR/Cas9- loxP -Mediated Gene Editing as a Novel Site-Specific Genetic Manipulation Tool.** *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, [s.l.], v. 7, p. 378–386, 2017. ISSN: 21622531, DOI: 10.1016/j.omtn.2017.04.018.

WHO. [s.l.]: [s.n.], 2015. Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>.