

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**FILOGENÉTICA E AVALIAÇÃO DAS FERRO-SUPERÓXIDO
DISMUTASES DE *Trypanosoma cruzi* COMO ALVOS DE NOVOS
COMPOSTOS QUIMIOTERÁPICOS**

por

Jéssica Silqueira Hickson Rios

Belo Horizonte
Agosto/2022

TESE/DCS-IRR

J.S.H. RIOS

2022

JÉSSICA SILQUEIRA HICKSON RIOS

**FILOGENÉTICA E AVALIAÇÃO DAS FERRO-SUPERÓXIDO
DISMUTASES DE *Trypanosoma cruzi* COMO ALVOS DE NOVOS
COMPOSTOS QUIMIOTERÁPICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

Orientação: Dra. Silvane Maria Fonseca Murta

Coorientação: Dra. Laila Alves Nahum

Belo Horizonte
Agosto/2022

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB 6 3740/00

R479f
2022

Rios, Jéssica Silqueira Hickson.

Filogenética e avaliação das famílias das ferro-superóxido dismutase de *Trypanosoma cruzi* como alvos de novos compostos quimioterápicos / Jéssica Silqueira Hickson Rios. – Belo Horizonte, 2022.

XII, 85 f., il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 64-71

Tese (Doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutora em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Filogenética. 3. Evolução molecular. 4. Desenvolvimento farmacológico. Título. II. Murta, Silvane Maria Fonseca (Orientação). III. Nahum, Laila Alves (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.93

JÉSSICA SILQUEIRA HICKSON RIOS

**FILOGENÉTICA E AVALIAÇÃO DAS FERRO-SUPERÓXIDO
DISMUTASES DE *Trypanosoma cruzi* COMO ALVOS DE NOVOS
COMPOSTOS QUIMIOTERÁPICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

Orientação: Dra. Silvane Maria Fonseca Murta

Coorientação: Dra. Laila Alves Nahum

Banca Examinadora:

Presidente Prof. Dra. Silvane Maria Fonseca Murta (Instituto René Rachou/FIOCRUZ)

Titular Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo (Instituto René Rachou/FIOCRUZ)

Titular Dra. Paloma Helena Fernandes Shimabukuro (Instituto René Rachou/FIOCRUZ)

Titular Dra. Diana Bahia (Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG)

Titular Philippe Vieira Alves (Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG)

Suplente Roberta Lima Caldeira (Instituto René Rachou/FIOCRUZ)

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 30/08/2022

Dedico essa tese à minha mãe, que foi quem me apresentou a carreira acadêmica e incentivou toda minha trajetória até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela valiosa oportunidade de realizar uma pós-graduação em uma instituição tão importante, com orientação de profissionais preparados e em um ambiente saudável. Quando penso na experiência, os sentimentos são de orgulho, superação e paz.

Sou eternamente grata à Dra. Laila Nahum por ter me acolhido no doutorado e acreditado no meu compromisso, responsabilidade e carinho com as atividades profissionais. Além de ser uma pessoa incrível, honesta e bondosa. Agradeço à Dra. Silvane Murta pelo suporte e aprendizado que levarei para a vida toda e por ser um exemplo de dedicação, respeito e sinceridade.

Durante todo o doutorado, me senti muito confortável em conversar com minhas orientadoras sobre questões tanto de trabalho quanto pessoais em que eu poderia ter auxílio no ambiente de trabalho. Isso foi essencial e mostra que existe preocupação com o andamento do projeto e com a saúde mental dos alunos.

Agradeço aos funcionários e colegas dos grupos de pesquisa Genômica Funcional de Parasitos e Informática de Biosistemas, Bioengenharia e Genômica. Certamente uma equipe em que todos torcem por todos. Em especial, aos meus alunos maravilhosos de iniciação científica Lucas Athayde (meu Luquito), Thainá Miranda e Millena Fernandes. Além de Elvira Horácio, Lívia Santos, Caroline Penido, Rafaela Donadoni e vários outros amigos do IRR.

Um sincero obrigada a toda equipe da Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, Fiocruz Minas, pelos esclarecimentos e auxílio.

Todo apoio familiar e de amigos também foi essencial para minha motivação. Ter pais que te orientam e te dão suporte já é bom e raro, imagina ter pais, tios, avós, primos e amigos como eu tive. Isso faz toda a diferença! Minha mãe Rosângela Hickson foi a pessoa que fez eu me sentir capacitada desde o início. Sempre me incentivando e aconselhando. Meu pai José Eguimar Rios sempre foi meu ser humano favorito, absolutamente encantado com a carreira que a filha escolheu.

Agradeço também ao meu amado noivo Thiago Miranda, que entrou em minha vida na metade do doutorado e que compartilha comigo a vivência na área da saúde e na pós-graduação. Sempre muito otimista e interessado pela ciência.

Em um mundo cheio de problemas graves, muitas pessoas sem oportunidades e sem atenção, poder contribuir na ciência é algo digno de gratidão eterna, realização profissional e pessoal. É por isso que meu papel como biomédica é e sempre será compartilhar todo o conhecimento adquirido para ajudar as pessoas.

Agradeço às Agências Financiadoras que tornaram esse trabalho possível, incluindo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fiocruz do Rio de Janeiro.

RESUMO

A doença de Chagas é uma zoonose negligenciada causada pelo protozoário parasito *Trypanosoma cruzi*. Dados epidemiológicos mostram que a doença afeta mais de seis milhões de pessoas no mundo. Os únicos fármacos disponíveis para o tratamento clínico são o benzonidazol e o nifurtimox. No entanto, ambos são muito tóxicos e a eficácia de cura principalmente na fase crônica da doença é baixa, sendo dependente de fatores como a susceptibilidade das cepas de *T. cruzi* aos fármacos e fisiologia do hospedeiro. O sistema de defesa antioxidante do parasito é um potencial alvo para a busca de novos compostos para tratamento da doença de Chagas. Esse mecanismo é responsável por manter o ambiente intracelular reduzido, protegendo o parasito contra o estresse oxidativo. As enzimas ferro-superóxido dismutases (FeSODs) atuam neste sistema promovendo a metabolização do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio. As FeSODs apresentaram resultados promissores como alvos de novos compostos *anti-T. cruzi* previamente testados. O ferro é ausente nas SODs humanas, o que reforça o potencial dessas enzimas como alvos de novas abordagens quimioterápicas. Além disso, os genes das FeSODs do tipo A, foram descritos como genes essenciais para parasitos do gênero *Leishmania*. O objetivo geral do presente estudo foi prever a biodiversidade molecular e relações evolutivas dos genes codificadores das FeSOD-A e FeSOD-B em diferentes cepas de *T. cruzi*. Foram obtidas sequências dos genes da FeSOD-A e FeSOD-B de 35 cepas de *T. cruzi* (Discrete Typing Units - DTUs: TcI a TcVI), de diferentes hospedeiros e regiões geográficas. Outras sequências de FeSODs foram recuperadas de bancos de dados públicos. Nossos resultados sugerem que as FeSODs do parasito são membros de famílias proteicas. A busca por sequências codificadoras dos diferentes tipos de FeSODs no genoma do parasito sugere que existam duas cópias do gene da FeSOD-A, quatro de FeSOD-B e outras quatro de FeSOD-C no clone híbrido CL Brener. A inferência filogenética revelou a presença de duas potenciais variantes funcionais de cada tipo de FeSOD estudada no parasito. Nossos resultados apoiam a hipótese de evolução dessas variantes por duplicação gênica seguida de divergência. As árvores apresentaram um grupo monofilético composto por todos os genes das cepas da DTU TcIV nas topologias de FeSOD-A e FeSOD-B. Hipotetizamos que a evolução dessas enzimas é concernente com parte da evolução de *T. cruzi*. Além disso, realizamos testes *in vitro* de dois compostos (mangafodipir e polaprezinc) que interagem com as FeSODs de *T. cruzi*, contra formas amastigotas e tripomastigotas do parasito. O mangafodipir teve um baixo efeito tripanocida e o polaprezinc foi inativo. Nosso estudo contribuiu para um melhor entendimento sobre a biodiversidade molecular das FeSODs de *T. cruzi* sob uma perspectiva evolutiva. Propomos uma abordagem eficaz para a pesquisa de potenciais famílias gênicas alvo de novos compostos tripanocidas.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, ferro superóxido dismutase, defesa antioxidante, inferência filogenética, evolução molecular, alvos de fármacos.

ABSTRACT

Chagas disease is a neglected zoonosis caused by protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. Epidemiologic data demonstrate that the disease affects over six million people worldwide. The only drugs available for the clinical treatment are the benznidazol and nifurtimox. However, these drugs are highly toxic and the cure efficacy remains low in the disease chronic phase and dependent on factors such as the susceptibility of *T. cruzi* strains to the drugs and physiological conditions of the host. The antioxidant defense system of the parasite is a potential target for developing new drugs for the treatment of Chagas disease. This mechanism is responsible for keeping the intracellular environment reduced and protecting the parasite against oxidative stress. Superoxide dismutases (FeSODs) act in this system by promoting the metabolization of the superoxide anion into peroxide hydrogen and oxygen. Fe-SOD could be a promising target in the design of new anti-*T. cruzi* drugs that were previously tested. Iron (Fe) is absent in the human SODS, which reinforces that these enzymes are a promising molecular target for new hemotherapeutic approaches. In addition, FeSOD-A genes have been described as essential genes for *Leishmania* parasites. The general objective of the present study was to predict the molecular biodiversity and evolutionary relationship of the isoforms FeSOD-A and FeSOD-B coding genes in different *T. cruzi* strains. We obtained sequences of FeSOD-A and FeSOD-B genes from 35 *T. cruzi* strains (Discrete Typing Units - DTUs: TcI to TcVI) isolated from different hosts and from different geographic areas. Other FeSOD sequences were retrieved from public databases. Our results suggest that the FeSODs of the parasite are members of protein families. The search for coding sequences of the different isoforms of the FeSODs in the parasite's genome suggest that there are two copies of FeSOD-A, four of the FeSOD-B and other four copies of the FeSOD-C in the hybrid clone CL Brener. The phylogenetic inference revealed the presence of two potential functional variants of each isoform studied. We also propose that the two possible functional variants were originated by duplication events followed by divergence. The trees show a monophyletic group composed by all gene strains of DTU TcIV in the topologies of the FeSOD-A and FeSOD-B. We believe that the evolution of these enzymes is correlated with part of the evolution of *T. cruzi*. Furthermore, we performed *in vitro* tests of two drugs (mangafodipir and polaprezinc) that interact with FeSODs of *T. cruzi*, which act against amastigote and trypomastigote parasite stages. Mangafodipir had a low trypanocidal effect and polaprezinc was inactive. Our study contributed to a better understanding of the molecular biodiversity of the FeSODs of the *T. cruzi* from an evolutionary perspective. We provided an effective approach to the research of potential gene families which may be targets for new trypanocidal drugs.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, iron superoxide dismutase, antioxidant defense, phylogenetic inference, molecular evolution, drug target.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição mundial da doença de Chagas e estimativa do número de infectados	13
Figura 2: Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	17
Figura 3: Sistema de defesa antioxidante de <i>T. cruzi</i>	21
Figura 4: <i>Base block</i> para reconstrução das árvores por inferência Bayesiana	44
Figura 5: Gel de agarose corado com GelRed mostrando as bandas de FeSODs de oito cepas do estudo	49
Figura 6: Relações evolutivas das 46 FeSODs do tipo A de <i>T. cruzi</i> obtidas no presente trabalho e aquelas disponíveis em bancos de dados públicos.....	52
Figura 7: Relações evolutivas das 36 FeSODs do tipo B de <i>T. cruzi</i> obtidas no presente trabalho e aquelas disponíveis em bancos de dados públicos.....	53
Figura 8: Diagrama apresentando as diferenças entre os genes de FeSOD-A, FeSOD-B e FeSOD-C de <i>T. cruzi</i>	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características dos iniciadores para amplificação dos genes de FeSOD-A e FeSOD-B de <i>T. cruzi</i>	32
Tabela 2: Informações das cepas e clones de <i>T. cruzi</i> utilizados no estudo.....	34
N: Probabilidade de erro e acurácia de bases por escala de qualidade <i>Phred</i>	37
Tabela 4: Informações sobre as sequências selecionadas para reconstrução filogenéticas do estudo.....	40
Tabela 5: Número de genes que codificam os domínios PF00081 e PF02777 das FeSODs de <i>T. cruzi</i>	47
Tabela 6: Características da montagem dos genes de FeSOD-A e FeSOD-B em cada cepa do estudo.....	50
Tabela 7: Atividade dos compostos contra os parasitos.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIC - Akaike Information Criterion

aLRT - *approximate likelihood-ratio test*

APX - ascorbato peroxidase

ASDSF - *average standard deviation of split frequencies*

BZ – benzonidazol

CC- concentração citotóxica

CPRG - *chlorophenol red-beta-D-galactopyranoside*

Cu-ZnSODs - cobre-zinco-superóxido dismutase

DGF-1 - *dispersed gene family*

DTUs - *discrete typing units*

ESS - *estimated sample size*

ENA - European Nucleotide Archive

FeSODs - ferro superóxido dismutases

H₂O - água

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

IC₅₀ - Inibição de 50% do crescimento

MASP - *mucin associated surface protein*

MCMC - *Markov chain Monte Carlo*

MLST - *multilocus sequence typing*

MnSOD - manganês-superóxido dismutase

NFX - nifurtimox

NH₂ - grupo amino

NO₂ - grupo nitro

O₂⁻ - ânion superóxido

ONOO⁻ - peroxinitrito

ORF - *open reading frame*

OTUs - *operational taxonomic units*

pb - pares de bases

PDB - Protein Data Bank

pIs - pontos isoelétricos

PSRF - *potential scale reduction factor*

PTS-1 - *one peroxisome-targeting signal of type 1*

PTUs - *polycistronic transcription units*

RefSeq – Reference Sequence Database

RHS - *retrotransposon hot-spot protein*

RPMI - *Roswell Park Memorial*

SI - *selectivity index*

SLTS - *spliced leader trans-splicing*

SODs - superóxido-dismutases

TR - tripanotiona redutase

TryS - tripanotiona sintetase

TXNPx - triparedoxina peroxidase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Doença de Chagas e <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
1.1.1 Dimensões epidemiológicas	13
1.1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
1.1.3 Genoma de <i>T. cruzi</i>	15
1.1.4 Aspectos da doença de Chagas	16
1.1.5 Limitações do tratamento	18
1.2 Defesa antioxidante de <i>T. cruzi</i> e FeSODs	19
1.3 Filogenética	23
1.3.1 Definição e eventos associados à homologia	23
1.3.2 Árvores filogenéticas	24
1.3.3 Método de máxima verossimilhança	25
1.3.4 Método de inferência Bayesiana	26
1.3.5 Aplicações e importância dos estudos de filogenia	27
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVO	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivos específicos	29
4. METODOLOGIA	29
4.1 Avaliação da FeSOD como membro de família multigênica	29
4.2 Predição das proteínas homólogas das FeSODs de <i>T. cruzi</i>	30
4.3 Amplificação dos genes das FeSODs de <i>T. cruzi</i>	30
4.3.1 Desenho de iniciadores	30
4.3.2 Extração do DNA	33
4.3.3 Reação de PCR	33
4.4 Sequenciamento dos genes	36
4.5 Montagem dos genes	37
4.6 Determinação do número de cópias dos genes das FeSODs de <i>T. cruzi</i>	38
4.7 Bases de dados para reconstrução das árvores filogenéticas das FeSODs	38
4.8 Alinhamento das sequências	41
4.9 Escolha do modelo evolutivo	41
4.10 Reconstrução das árvores filogenéticas das FeSODs pelo método de máxima verossimilhança	42

4.11 Reconstrução das árvores filogenéticas das FeSODs pelo método de inferência Bayesiana	42
4.12 Pesquisa de compostos que interagem com as FeSODs	44
4.13 Ensaios <i>in vitro</i> de compostos contra o <i>T. cruzi</i>	44
5 RESULTADOS	46
5.1 Avaliação da FeSOD como membro de família multigênica	46
5.2 Predição das proteínas homólogas das FeSODs de <i>T. cruzi</i>	47
5.3 Determinação do número de cópias dos genes das FeSODs em <i>T. cruzi</i>	48
5.4 Obtenção dos genes das FeSODs de <i>T. cruzi</i>	48
5.5 Reconstrução das árvores filogenéticas das FeSODs	51
5.6 Pesquisa de compostos que interagem com as FeSODs	55
5.6.1 Seleção dos compostos	55
5.6.2 Ensaios <i>in vitro</i>	56
6 DISCUSSÃO	57
7 CONCLUSÕES	61
8 PERSPECTIVAS	61
9 REFERÊNCIAS	63
10 APÊNDICES	71

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas e *Trypanosoma cruzi*

1.1.1 Dimensões epidemiológicas

Carlos Chagas médico sanitarista brasileiro identificou pela primeira vez o protozoário parasito *Trypanosoma cruzi*. Esse é um parasito hemoflagelado da família Trypanosomatidae e ordem Kinetoplastida (WHO, 2020). Carlos Chagas descobriu todo o ciclo da doença: o agente etiológico *T. cruzi* e seu ciclo de vida, relevando seus hospedeiros intermediários, os insetos triatomíneos; os reservatórios domésticos; e a patologia (CHAGAS, 1909). Em homenagem ao brilhante pesquisador, a doença recebeu o nome de doença de Chagas. É uma parasitose também chamada de tripanossomíase americana, ocorrendo principalmente nas Américas desde os Estados Unidos até Argentina e Chile. A doença também afeta países de outros continentes, estando mais associada à migração de pessoas para regiões não endêmicas (SCHMUNIS, 2007) (Figura 1). Os dados epidemiológicos expandiram com relatos de casos em países da Europa, Ásia e Japão, sendo a maioria originados de transmissão via transfusão sanguínea. Estima-se que existam mais de seis milhões de infectados no mundo (WHO, 2020). Entretanto, a subnotificação de casos e de mortes é uma realidade sem presunções estatísticas.

Figura 1: Distribuição mundial da doença de Chagas e estimativa do número de infectados.



Fonte: WHO, 2018.

1.1.2 *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é capaz de infectar centenas de espécies de vetores (Reduviidae: Triatominae) e hospedeiros mamíferos, o que o caracteriza como um parasito com ciclo de transmissão extremamente diverso (FREITAS *et al.*, 2006). As cepas de *T. cruzi* apresentam grande variedade morfológica, bioquímica e genotípica, o que interfere diretamente no quadro clínico dos indivíduos chagásicos. Para que fosse possível identificar as cepas por perfil genético e fenotípico, foi preconizado um sistema de classificação que diferencia os parasitos em unidades discretas de tipagem (do inglês *discrete typing units* ou DTUs) de I à VI (TcI – TcVI) (ZINGALES *et al.*, 2009; ZINGALES *et al.*, 2012). Existe uma sétima DTU, chamada de TcBat, respectiva de um genótipo de parasitos infectivos de morcegos (HAMILTON *et al.*, 2011).

A DTU pode determinar manifestações clínicas cuja gravidade pode variar de acordo com a região geográfica. A infecção humana por TcI é mais prevalente no norte da América do Sul, América Central e México e está relacionada principalmente ao ciclo silvestre (FALLA *et al.*, 2009; CURA *et al.*, 2010). O isolamento de parasitos TcII está relacionado principalmente a ciclos de infecção doméstica nas regiões sul e central da América do Sul (CARRANZA *et al.*, 2009). As TcIII estão mais associadas com o ciclo silvestre no nordeste da Venezuela até a Argentina (MONTEIRO *et al.*, 2010; HERNÁNDEZ *et al.*, 2016). Assim como as DTUs TcIII, as TcIV também estão predominantemente associadas ao ciclo silvestre, porém nas regiões na América do norte e América do sul. Já as TcV e TcVI, estão fortemente associadas com a infecção humana em países da região sul da América do Sul (GARZON *et al.*, 2002; ZINGALES *et al.*, 2017).

A infecção experimental por TcI e TcII em camundongos, mostrou que as TcI foram altamente infecciosas e patogênicas, enquanto que os animais que foram infectados com *T. cruzi* TcII, apresentaram baixa infectividade (CAMANDAROBA *et al.*, 2002). No entanto, esses resultados foram controversos com alguns estudos de infecção humana. Por exemplo, a presença de infectados por TcII com a forma crônica sintomática foi encontrada amplamente em diversos estados brasileiros na década de 80 (BARRETT *et al.*, 1980; LUQUETTI *et al.*, 1986). Na Argentina e na Bolívia, a cronicidade com manifestações cardíacas e/ou digestivas, foi associada a infecções tanto por TcII, quanto por TcV e TcVI (PUERTO *et al.*, 2010; CURA *et al.*, 2012; ZINGALES *et al.*, 2017).

1.1.3 Genoma de *T. cruzi*

Em 2005, foram publicados 32.746 *contigs* do genoma do clone CL Brener de *T. cruzi*, parcialmente montados em 638 *scaffolds* que não correspondem aos cromossomos completos do parasito. Neste estudo, a estimativa do número de sequências gênicas por haplótipo foi de 12.570 genes. Foi observado que cerca de 50% do genoma constitui-se de retrotransposons, repetições subteloméricas e sequências repetitivas codificadoras de proteínas de superfície (EL-SAYED *et al.*, 2005).

O clone CL Brener é um mosaico originado da fusão de cepas das DTUs de *T. cruzi* dos tipos TcII (nomeada CL Brener Esmeraldo-Like) e TcIII (nomeada CL Brener Não-Esmeraldo-Like) (BRISSE *et al.*, 2011). Levando em consideração esse caráter híbrido do clone CL Brener, em 2009 foi feita a ampliação da organização dos dados genômicos e aprimoramento da anotação dos haplótipos preditos dos genes dos cromossomos homólogos Esmeraldo-like e Esmeraldo-não-like representativos de cada alelo. Foram montados 41 cromossomos, em que mais de 23% dos genes anotados foram associados à trans-sialidases, mucinas de superfície proteica (do inglês *mucin associated surface protein* ou MASP), retrotransposons de proteínas *hot-spot* (do inglês *retrotransposon hot-spot protein* ou RHS), moléculas GP63 e famílias dispersas de genes (do inglês *dispersed gene family* ou DGF-1) (WEATHERLY *et al.*, 2009). Foi considerada a possibilidade da existência de mais de 20.000 genes adicionais ocultos devido ao colapso das leituras durante a montagem (ARNER *et al.*, 2007).

Por outro lado, após 10 anos considerando os avanços das tecnologias de sequenciamento, o genoma da cepa Sylvio foi obtido, sendo composto por 47 cromossomos. Um percentual de 79,9% desse genoma corresponde às sequências codificadoras de proteínas. Com base nestes achados, foram identificados 239 conjuntos de genes funcionalmente relacionados, totalizando 1.632 genes que correspondem a 52% do transcrito (CALLEJAS-HERNÁNDEZ *et al.*, 2019).

O processo de transcrição em *T. cruzi* ocorre com a síntese de longos RNAs contendo até centenas de genes. Esses RNAs são chamados de unidades policistrônicas (do inglês *polycistronic transcription units* ou PTUs) (GAUDENZI *et al.*, 2011). A maturação desses transcritos é feita através do processamento por *spliced leader trans-splicing* (SLTS) e adição de uma calda de poliadenilação na extremidade 3' para formação de unidades monocistrônicas maduras. Logo, o compilado de dados obtidos até o momento nos níveis do genoma e transcrito, oferece uma grande melhora na anotação desses genes ao longo do tempo (CALLEJAS-HERNÁNDEZ *et al.*, 2019).

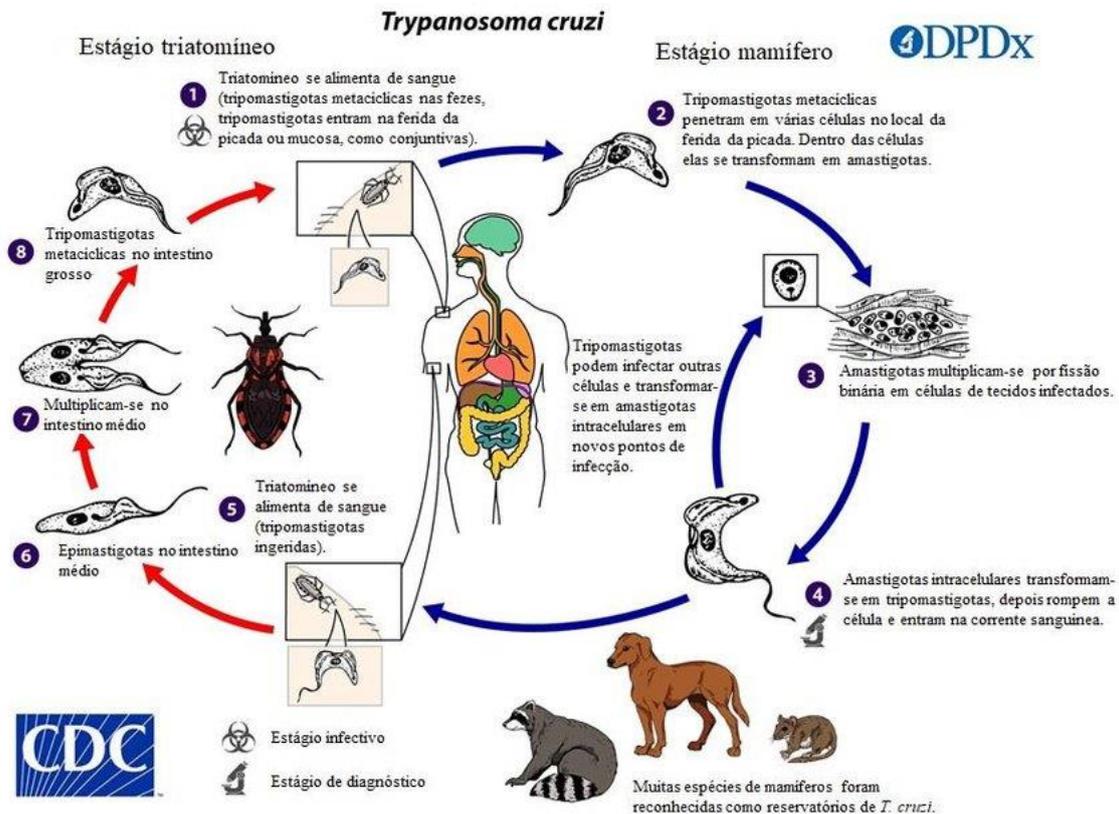
1.1.4 Aspectos da doença de Chagas

A transmissão de *T. cruzi* pode ocorrer pelas seguintes formas: transmissão vetorial pelo contato da pele com fezes e urina de insetos triatomíneos infectados, transfusão sanguínea, transmissão congênita, transmissão oral por alimentos contaminados ou por acidentes laboratoriais.

Durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado, os triatomíneos infectados liberam fezes ou urina contendo as formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*. Essa forma do parasito penetra na pele e mucosas no local da picada, devido ao fato do indivíduo sentir um leve incômodo e coçar a região como forma de reação à ação da saliva do triatomíneo que é injetada durante todo o seu processo de alimentação de sangue. Os parasitos alcançam a corrente sanguínea e iniciam seu ciclo intracelular, onde se diferenciam em amastigotas. No ambiente intracelular, as formas amastigotas se proliferam por divisão binária e se transformam em tripomastigotas sanguíneas, que rompem as células. Uma vez livres na corrente sanguínea, os parasitos são ingeridos pelos hospedeiros invertebrados ou infectam novas células de diversos tecidos, se transformando em amastigotas intracelulares nos novos locais de infecção (Figura 2). A infecção dos tecidos pelos parasitos pode provocar graves lesões musculares (MILLÁS, 2016) (Figura 2).

Figura 2: Ciclo de vida de *T. cruzi*.

As setas azuis (2, 3 e 4) apresentam as etapas do ciclo que ocorrem no hospedeiro vertebrado, enquanto que as setas em vermelho (1, 5, 6, 7 e 8) mostram o que acontece no hospedeiro invertebrado. A figura apresenta alguns dos reservatórios de *T. cruzi* e uma sinalização para especificação dos estágios do parasito que são infecciosos e estágios de desenvolvimento detectáveis através de técnicas de diagnóstico da doença.



Fonte: CDC.

A via clássica de transmissão dos parasitos pelas fezes e urina dos barbeiros infectados, durante o repasto sanguíneo, foi a responsável pela grande maioria dos casos brasileiros. No entanto, após a inserção de estratégias de controle do *Triatoma infestans* (espécie alóctone), dados epidemiológicos mostram que a transmissão oral por alimentos contaminados é a responsável pela maioria dos casos de doença de Chagas aguda no Brasil (MS, 2021). Atualmente, a principal espécie de triatomíneo transmissora de *T. cruzi* no Brasil é o *Panstrongylus megistus* (COURA & DIAS, 2009; GURGEL-GONÇALVES *et al.*, 2012), com exceção à região nordeste, onde o *Triatoma brasiliensis* é a espécie mais importante (BEZERRA *et al.*, 2020).

A gravidade da doença está associada à cepa infectante, carga parasitária, via de transmissão do parasito e presença de comorbidades. Na fase aguda, os parasitos residem principalmente na corrente sanguínea podendo ocasionar febre constante, porém, esse estágio da doença nem sempre apresenta sintomatologia. A maioria dos indivíduos que entram na fase

crônica, apresentam a forma indeterminada assintomática. No entanto, após alguns anos, cerca de 30% desenvolvem lesões musculares causando as diferentes formas clínicas da doença (RASSI JR. *et al.*, 2012). Nesta fase, os parasitos residem preferencialmente nos músculos cardíaco e digestivo, podendo causar as formas cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva da doença. A forma cardíaca apresenta risco de insuficiência cardíaca e a forma digestiva pode ser marcada pela ocorrência de megaesôfago e megacólon (WHO, 2020). Os danos podem ser irreversíveis e deixar sequelas que prejudicam a vida do indivíduo infectado (BRENER, 1987).

O controle da doença de Chagas é realizado principalmente através da aplicação de inseticidas nos locais onde o barbeiro foi encontrado. Outra forma de controle é feita através da triagem em banco de sangue e em cirurgias de doação de órgãos (CDC, 2019).

1.1.5 Limitações do tratamento

Os únicos fármacos específicos para o tratamento de pacientes chagásicos são o benzonidazol (BZ) e o nifurtimox (NFX) (SALES JR., *et al* 2017). Esses fármacos nitroheterocíclicos atuam como pró-fármacos e são ativados por nitroredutases que reduzem seu grupo nitro (NO_2) para grupo amino (NH_2), resultando em radicais livres que são auto-oxidados para formação de espécies reativas de oxigênio (MAYA *et al.*, 1997; CASTRO *et al.*, 2006). No caso do BZ, os produtos altamente reativos gerados pelas nitroredutases se ligam ao DNA, RNA, lipídios, proteínas e tióis de baixo peso molecular, inibindo assim o sistema antioxidante dos parasitos (WILKINSON & KELLY, 2009; TROCHINE *et al.*, 2014). Quando processado na mitocôndria, o BZ é convertido no radical nitro (NO_2) e no glioxal, altamente tóxicos para os parasitos (HALL & WILKINSON, 2012).

Já no caso do nifurtimox o mecanismo de ação está relacionado com a formação do ânion superóxido (O_2^-), que é convertido pelas superóxido dismutases em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 pode dar origem ao radical hidroxila (OH^\cdot) que se liga às moléculas do parasito, como DNA, RNA, lipídios, proteínas, danificando-as (TAPPEL, 1973; DOCAMPO *et al.*, 1981).

No entanto, o tratamento possui uma série de limitações como alta toxicidade, baixa capacidade de cura na fase crônica da doença e eficiência dependente da suscetibilidade da cepa de *T. cruzi* e fisiologia do hospedeiro (MOLINA *et al.*, 2015). A baixa eficácia quimioterápica ocorre principalmente na fase crônica da doença. Dados da literatura mostram que o BZ curou 76% dos pacientes chagásicos tratados na fase aguda e apenas 8% na fase crônica (CANÇADO,

1999). Outro estudo mostrou que a efetividade de cura na fase aguda foi de 76%, enquanto que, na fase crônica recente foi de 40% (SGUASSERO *et al.*, 2015).

Embora existam essas dificuldades, tanto o BZ quanto o NFX podem aumentar a qualidade e expectativa de vida dos infectados. Os dois fármacos são efetivos na redução da duração e gravidade clínica da doença de Chagas, sendo o BZ mais utilizado no contexto brasileiro (DIAS *et al.*, 2016).

Uma possível explicação para as baixas percentagens de cura em pacientes chagásicos crônicos é a existência de cepas de *T. cruzi* naturalmente resistentes ao mecanismo de ação dos fármacos. A quimioterapia também tem se mostrado problemática devido à resistência cruzada entre o BZ e o NFX. Essas dificuldades evidenciam a importância da busca de novos alvos terapêuticos e candidatos a fármacos contra o parasito (SOEIRO *et al.*, 2009).

1.2 Defesa antioxidante de *T. cruzi* e FeSODs

Os tripanosomatídeos estão expostos a intenso estresse oxidativo causado por subprodutos tóxicos resultantes do processo de metabolismo celular e agentes externos, como metabólitos de fármacos e mediadores imunes do hospedeiro. As principais espécies tóxicas reativas de oxigênio e nitrogênio pelas quais os parasitos são expostos, são o peroxinitrito (ONOO⁻/ONOOH), ânion superóxido (O₂^{•-}), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), hidroperóxidos (ROOH) e óxido nítrico (*NO) (FERRER-SUETA & RADI 2009). Para se protegerem, os tripanosomatídeos contam um poderoso e único mecanismo de desintoxicação de peróxidos dependente de tripanotiona, que difere daquele encontrado em vertebrados, sendo indicado como alvo racional para quimioterapia (SANTI & MURTA, 2022). Nos tripanosomatídeos, muitas enzimas de defesa antioxidante estão distribuídas em diversos compartimentos celulares e são ativadas contra vários oxidantes. Esse sistema de defesa contra o estresse oxidativo é constituído por um aparato enzimático capaz de lidar com espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

As enzimas do tipo superóxido dismutases (SODs) são componentes centrais do mecanismo de defesa antioxidante (MCCORD & FRIDOVICH, 1969). Estas metaloproteases (EC 1.15.1.1) removem o excesso de O₂^{•-} convertendo-os em O₂ e H₂O₂ (PIACENZA *et al.*, 2013).

Elas foram isoladas e caracterizadas em diversos organismos, incluindo bactérias e eucariotos (KIRBY *et al.*, 1981). São classificadas de acordo com seu grupo prostético presente no sítio ativo (cobre e zinco, ferro, manganês ou níquel) e encontradas em diferentes localizações celulares (BANNISTER *et al.*, 1987). Eucariotos geralmente possuem enzimas

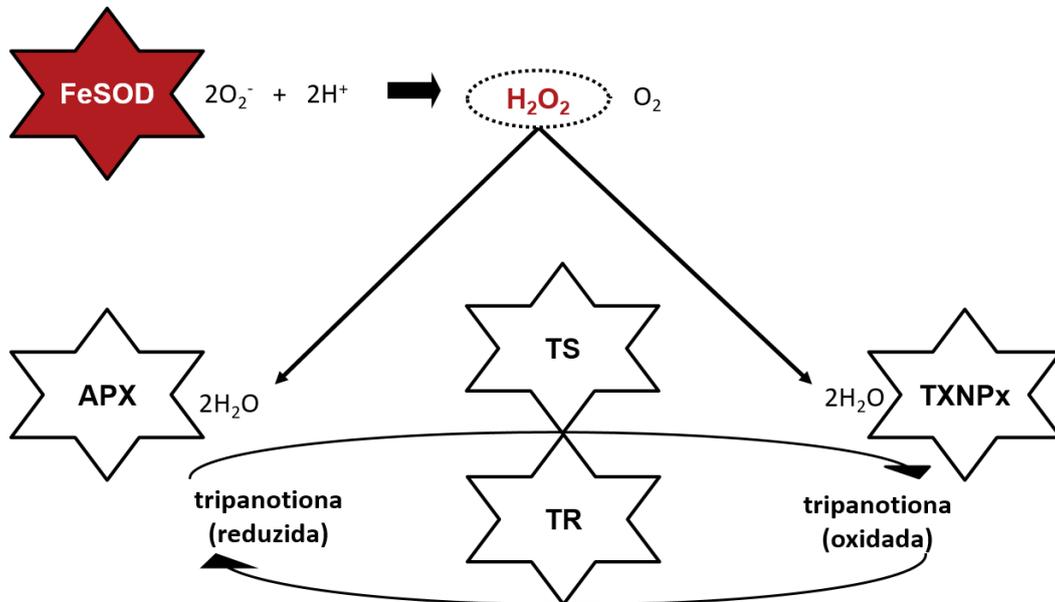
cobre-zinco (Cu/ZnSODs) e manganês (MnSODs). As FeSODs são encontradas em procariontes, protozoários, plantas e algas. Uma vez que FeSOD está ausente no hospedeiro humano, essas enzimas podem ser consideradas como alvos potenciais para quimioterapia contra os tripanosomatídeos (TURRENS, 2004; WILKINSON *et al.*, 2006).

Em humanos, as SODs descritas possuem como grupo prostético o manganês (MnSOD) (ZHANG, 1996) ou o cobre e zinco (Cu-ZnSODs) (KIM & KANG, 1997). Durante a infecção pelo *T. cruzi*, ocorre um aumento da expressão dos genes das MnSODs, como forma de defesa do organismo contra o estresse oxidativo induzido pelo parasito (ESTRADA *et al.*, 2018). O organismo do hospedeiro pode utilizar diversos outros mecanismos de ação contra o *T. cruzi*, que envolvem o recrutamento de diferentes elementos químicos. O peroxinitrito (ONOO^-) é uma molécula potencialmente tóxica que pode agir como fator determinante da sobrevivência ou morte dos parasitos no momento da infecção. Seu papel biológico diverso, envolve atividade protetiva contra patógenos, incluindo o *T. cruzi*, tendo como alvo, proteínas de sistemas de desintoxicação (FERRER-SUETA & RADI, 2009; MARTÍNEZ *et al.*, 2014). Dentre os oxidantes que atuam contra as SODs de *T. cruzi*, podemos citar o peróxido de hidrogênio (ação inibitória) (ISMAIL *et al.*, 1997; VILLAGRÁN *et al.*, 2005; MATEO *et al.*, 2008) e o paraquat, sendo este um composto orgânico que atua mediante mecanismos de indução de estresse oxidativo (ISMAIL *et al.*, 1997). Até o momento, a única classe de SOD detectada em *T. cruzi* é a ligada ao ferro (FeSODs) (TEMPERTON *et al.*, 1996; ISMAIL *et al.*, 1997; VILLAGRÁN *et al.*, 2005; MATEO *et al.*, 2008).

Na fase aguda da doença de Chagas, os macrófagos são as primeiras células invadidas pelo *T. cruzi* (MUÑOZ FERNÁNDEZ *et al.*, 1992). Antes de ir para o citoplasma, o parasito passa pelo ambiente altamente oxidativo do fagossomo. Durante a fagocitose, a enzima NADPH oxidase do parasito é ativada produzindo o ânion superóxido (O_2^-), que em seguida sofre dismutação em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio pelas FeSODs. Na mitocôndria, o peróxido de hidrogênio é convertido em água pela ascorbato peroxidase (APX). No retículo endoplasmático, quem realiza essa conversão é a triparedoxina peroxidase (TXNPx). Esse sistema é baseado no tiol específico desses parasitos tripanotiona ou $\text{T}(\text{SH})_2$, que é sintetizado pela tripanotiona sintetase (TryS) e metabolizado pela tripanotiona redutase (TR) a fim de manter o ambiente intracelular reduzido (Turrens, 2004) (Figura 3).

Figura 3: Sistema de defesa antioxidante de *T. cruzi*.

As FeSODs metabolizam o ânion superóxido (O_2^-), produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2). Na mitocôndria, o peróxido de hidrogênio é convertido em água (H_2O) pela ascorbato peroxidase (APX). No retículo endoplasmático, essa conversão é feita pela triparedoxina peroxidase (TXNPx). O sistema é baseado no tiol específico de tripanosomatídeos (tripanotiona), que é sintetizado pela tripanotiona sintetase (TryS). A tripanotiona redutase (TR) metaboliza a tripanotiona para manter o ambiente intracelular reduzido.



Fonte: Hickson *et al.*, 2022

Os genes codificadores das SODs de *T. cruzi* foram clonados e caracterizados pela primeira vez em 1996 por Temperton e colaboradores. Os genes foram identificados a partir do rastreamento por sonda em clones de uma biblioteca de DNA genômico da cepa X10.6 construída em cosmídeos. Foram purificados dois conjuntos de cosmídeos cada um contendo genes distintos de SODs (TEMPERTON *et al.*, 1996).

Em 1997, as FeSODs de *T. cruzi* foram detectadas a partir da observação de quatro pontos isoelétricos (pIs) diferentes em frações de formas epimastigotas da cepa Maracay em gel eletroforético de poliacrilamida. Após testes com inibidores dos cofatores Cu/Zn, Mn e Fe, as quatro SODs apresentaram inibição por peróxido de hidrogênio. Isso indica o ferro como grupo prostético dessas enzimas, uma vez que ele apresenta sensibilidade ao peróxido de hidrogênio enquanto os demais cofatores são resistentes ao mesmo (ISMAIL *et al.*, 1997). O parasito apresenta tipos variados de FeSODs que podem estar atuando em diferentes estágios do desenvolvimento e em regiões distintas (VILLAGRÁN *et al.*, 2005).

A localização das diferentes FeSODs varia entre as espécies de tripanosomatídeos (MATEO *et al.*, 2008). Em *Trypanosoma brucei*, a FeSOD-B1 é citosólica (sendo

minimamente encontradas no glicossoma), a FeSOD-B2 é encontrada no glicossoma (com detecção de pequena atividade no citosol) e as FeSOD-A e FeSOD-C são mitocondriais. Abordagens genômicas sugerem que o *T. cruzi* possua esses mesmos tipos de FeSODs descritas em *Trypanosoma brucei* (DUFERNEZ *et al.*, 2006). Em *Leishmania chagasi*, as FeSOD-B1 e FeSOD-B2 são glicossomais (PLEWES *et al.*, 2003).

Em bancos de dados públicos, as informações disponíveis de FeSODs de *T. cruzi* são de sequências de genes e proteínas anotadas como FeSOD-A e FeSOD-B ou sequências sem referência ao tipo de FeSOD. Os genes possuem comprimentos de cerca de 637 (FeSOD-A) e 588 (FeSOD-B) pares de bases (pb), podendo haver diferenças nesses valores entre as cepas do parasito (ISMAIL *et al.*, 1997; NOGUEIRA *et al.*, 2006). Existem três estruturas cristalográficas de FeSODs de *T. cruzi*. Elas estão disponíveis no Protein Data Bank (PDB) (GOODSELL *et al.*, 2020) com os identificadores: 2GPC (FeSOD-B) (BACHEGA *et al.*, 2009), 4DVH (FeSOD-A) (MARTÍNEZ *et al.*, 2014) e 4H3E (FeSOD-A) (PHAN *et al.*, 2015).

Esses dados de FeSODs em nível de sequência (nucleotídica e aminoacídica) e de estrutura, foram utilizados em diversos estudos de caracterização molecular (ISMAIL *et al.*, 1997; VILLAGRÁN *et al.*, 2005; BACHEGA *et al.*, 2009), determinação de expressão gênica, associação com drogas (NOGUEIRA *et al.*, 2006; SANZ *et al.*, 2008), funcionalidade (MATEO *et al.*, 2008), filogenética (DUFERNEZ *et al.*, 2006; LAUTHIER *et al.*, 2012) e importância das enzimas no desenvolvimento e sobrevivência do parasito (MARTÍNEZ *et al.*, 2014). Informações de mesma temática foram elucidadas em *T. brucei* (DUFERNEZ *et al.*, 2006) e espécies de *Leishmania* (PARAMCHUK *et al.*, 1997; GHOSH *et al.*, 2003; PLEWES, *et al.*, 2003).

Em 2006, nosso grupo de pesquisa mostrou que populações do *T. cruzi* resistentes ao BZ possuem aumento da expressão da enzima FeSOD-A e maior atividade enzimática (NOGUEIRA *et al.*, 2006). Interessante também ressaltar que linhagens das espécies *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis* resistentes ao antimônio trivalente apresentam maior expressão da enzima FeSOD-A e atividade enzimática (TESSAROLLO *et al.* 2014). Outro estudo mostrou que parasitos mutantes de *L. infantum* que possuem baixa expressão de FeSOD-A, apresentam maior resistência aos fármacos antimônio trivalente e miltefosina (SANTI *et al.*, 2021). Além disso, análises de infecção com esses parasitos mostraram que as FeSOD-A reduzem a infecção de macrófagos e multiplicação intracelular dos parasitos. Nesse mesmo estudo, foram aplicadas três metodologias diferentes na tentativa de deletar os genes de

FeSODs. No entanto, todas as estratégias falharam, mostrando que os genes de FeSOD-A, são classificados como essenciais para *Leishmania* (SANTI *et al.*, 2021).

Esses trabalhos destacam a presença de diferentes tipos de FeSODs, em variadas localizações celulares e com características distintas, o que retrata um perfil enzimático diverso que garante aos parasitos um sistema de defesa antioxidante altamente eficaz, favorecendo seu crescimento, sobrevivência, infectividade e conseqüentemente sua virulência.

Esse cenário evidencia a importância de estudos sobre o potencial das FeSODs como alvos de novos compostos e estratégias de reposicionamento de fármacos para a doença de Chagas (TURRENS *et al.*, 2004; WILKINSON *et al.*, 2006). Até o momento foram identificados diversos compostos promissores atuantes contra alvos do sistema de defesa antioxidante dos tripanosomatídeos (LEROUX & KRAUTH-SIEGEL 2016).

No entanto é necessário um entendimento mais abrangente sobre a diversidade molecular desses componentes da defesa antioxidante, bem como o impacto dessas características no desenvolvimento de estratégias mais eficazes para o tratamento da doença de Chagas e demais doenças negligenciadas causadas por tripanosomatídeos. Apesar da doença de Chagas ser negligenciada, ela teve sua visibilidade aumentada com a oficialização do dia mundial do combate à doença (14 de abril). Além disso, a forma crônica da doença foi inserida como doença de notificação compulsória nacionalmente pela Portaria nº 264, de 17 de fevereiro de 2020, visto que, anteriormente somente a forma aguda estava incluída na lista de doenças de notificação compulsória e imediata.

1.3 Filogenética

1.3.1 Definição e eventos associados à homologia

A filogenética foi definida por Ridley e colaboradores como uma área da biologia evolutiva que visa a reconstrução das relações evolutivas entre organismos, macromoléculas, ecossistemas ou quaisquer entidades com mesma origem evolutiva (homólogas). No caso das macromoléculas, os táxons ou unidades taxonômicas operacionais (do inglês *operational taxonomic units* - OTUs) são sequências de DNA, RNA ou proteínas (RIDLEY, 2003).

Com base em dados moleculares, o evolucionista Walter Fitch estabeleceu que a homologia entre genes pode estabelecer relações de paralogia e ortologia. Genes parálogos são aqueles que divergiram entre si após uma duplicação, enquanto os ortólogos divergiram entre duas espécies após especiação (FITCH, 1970). Esses eventos são responsáveis pela variação do número de homólogos presentes em uma família gênica em diferentes espécies, podendo

ocorrer perda e ganho de genes (GABALDÓN, 2007). Além disso, as macromoléculas podem apresentar biodiversidade em nível de sequência e/ou estrutura por ocorrência de transferência lateral de genes, processamentos de *trans-splicing*, mutação, amplificação gênica, recombinação, conversão gênica, embaralhamento de domínios ou de éxons, fusão de genes, dentre outros (PAGE & HOLMES, 1998). O principal mecanismo de evolução de genes é a duplicação gênica seguida de divergência (OHNO, 1970).

1.3.2 Árvores filogenéticas

As árvores filogenéticas são representações de hipóteses de relações de ancestralidade entre as OTUs. A obtenção das árvores advém de algoritmos que podem ter a incorporação do princípio do método para reconstrução de uma única árvore ou podem utilizar critérios pré-estabelecidos para realizar a busca de uma árvore que em meio a um conjunto de árvores. Um exemplo de método frequentemente embutido no algoritmo é o método de distâncias, que funciona reduzindo a variação entre as sequências par a par à uma medida de distância entre elas para estimar a árvore resultante. Já os algoritmos de escolha de árvore, baseiam-se em métodos de otimização de caracteres, sendo corriqueiramente aplicados aos métodos de máxima parcimônia, máxima verossimilhança e inferência Bayesiana. Independentemente do método utilizado, o objetivo final é estabelecer uma presunção da história evolutiva (topologia) das OTUs (MATIOLI & FERNANDES, 2012).

A reconstrução da árvore requer primeiramente a construção de uma matriz de distâncias par-a-par através de modelos matemáticos (MATIOLI & FERNANDES, 2012). Os modelos evolutivos funcionam descrevendo a probabilidade de mudança de um nucleotídeo ou aminoácido por outro. Existem diferentes programas para predição do modelo que melhor descreve a base de dados observada (BARTON *et al.* 2007).

No caso dos algoritmos de seleção de árvores, o modelo adotado não influencia no algoritmo escolhido, porém, reflete na estimativa do tempo de divergência entre as sequências (tamanho dos ramos) e na topologia (história evolutiva hipotetizada). A escolha do programa também pode ter implicações no resultado. O PhyML (GUINDON *et al.*, 2010) é um exemplo de software de heurística rápida e precisa para estimar filogenias de sequências moleculares pelo método de máxima verossimilhança. Já a filogenética pelo método de Inferência Bayesiana, pode ser realizada no programa MrBayes (RONQUIST *et al.*, 2012), em que a árvore final não é um consenso de todas as outras árvores, o que mantém a topologia em todas as predições realizadas (MATIOLI & FERNANDES, 2012).

1.3.3 Método de máxima verossimilhança

O método de máxima verossimilhança calcula as probabilidades de evolução de caracteres de acordo com o modelo utilizado para explicação dos dados. O cálculo é feito considerando a taxa de substituição entre pares de bases e sua heterogeneidade (sendo as substituições mais recorrentes na terceira base do códon), a frequência dessas bases e a proporção de sítios invariáveis do alinhamento. A probabilidade L é determinada de acordo com o modelo evolutivo aplicado E , dada a topologia T e o comprimento dos ramos B para inferir a evolução dos dados D , função:

$$L(T, B, E|D) = f(D|T, B, E)$$

O método infere todas as topologias possíveis e as variações de comprimento dos ramos de cada uma delas. Para isso, a verossimilhança é maximizada a partir do cálculo das probabilidades de ocorrência de todos os estados de caracteres ancestrais possíveis, considerando que a base foi a mesma ou as outras três (A, G, T e C). A árvore que melhor representa as relações filogenéticas de acordo com o modelo evolutivo adotado é a mais verossímil.

A inferência filogenética por máxima verossimilhança pode ser atribuída ao teste estatístico de *bootstrap*. Este recurso visa estimar a variância associada às distâncias através de reamostragens dos dados, com reposição, avaliando a distribuição das bases em cada sítio do alinhamento. O objetivo é avaliar o grau de confiança dos conjuntos de dados indicados pela topologia das árvores.

Cada reamostragem gera uma árvore (pseudoréplica) e a proporção de *bootstrap* é a porcentagem de vezes que o mesmo subconjunto de dados foi recuperado nas árvores. Assim, é possível avaliar o quanto a topologia é modificada de acordo com a reamostragem e consequentemente revelar a consistência interna dos dados (quanto mais modificações, menor é o valor de *bootstrap*). A quantidade de pseudorélicas que se deseja reamostrar é escolhida pelo próprio usuário, sendo considerada bem representativa a reconstrução de 500 a 1000 pseudorélicas.

Uma grande vantagem do método de máxima verossimilhança é que ele é robusto e menos sensível a erros de amostragem quando comparado aos métodos geométricos e de parcimônia (MATIOLI & FERNANDES, 2012).

1.3.4 Método de inferência Bayesiana

A inferência Bayesiana está relacionada com a máxima verossimilhança “invertendo” o problema a partir da probabilidade posterior $[L(H | D)]$ de que a hipótese H seja verdadeira assumindo probabilidades $L(H)$ à priori que atribuem H antes que D tenha sido verificado. A função $L(D | H)$ maximiza a verossimilhança e $L(D)$ é uma constante de normalização que restringe $[L(H | D)]$ de zero a um:

$$L(D) = \frac{L(H) \times L(D|H)}{L(D)}$$

Ao contrário da máxima verossimilhança, o método Bayesiano considera que os dados e os parâmetros são variáveis aleatórias, o que garante que a filogenia não seja acometida por uma característica específica. Desta forma, a probabilidade posterior tem a função de estimar a incerteza sobre os parâmetros adotados. Isso é feito através de um comparativo da distribuição das estimativas de máxima verossimilhança para diversos conjuntos de dados independentes (topologia, comprimento de ramos, parâmetros de substituição de nucleotídeos e probabilidade a priori da base de dados) (MATIOLI & FERNANDES, 2012).

As filogenias inferidas pelo método Bayesiano são realizadas a partir de cadeias de Markov, que correspondem a uma sequência de variáveis aleatórias $X=(X_0, X_1, X_2...X_n)$ cuja probabilidade de estar em um determinado X_i no tempo t , depende dos estados anteriores. O algoritmo utilizado é o de Monte Carlo baseado em cadeias de Markov (do inglês *Markov chain Monte Carlo-MCMC*) (Huelsenbeck *et al.*, 2004). Trata-se de uma classe de algoritmos para modelagem da probabilidade de eventos associados aos dados amostrados. No caso da inferência filogenética, o MCMC propõe valores de apoio estatístico atribuídos ao cálculo da probabilidade posterior com base na frequência com que os ramos aparecem nas diferentes árvores amostradas e conseqüentemente estima a incerteza das relações de ancestralidade (DURBIN *et al.*, 1999).

Quando comparado ao método de máxima verossimilhança, apresenta menos robustez e consistência, porém demanda menor custo computacional e é menos sensível a ambigüidades do alinhamento (DURBIN *et al.*, 1999).

1.3.5 Aplicações e importância dos estudos de filogenia

A filogenética pode ser aplicada para estudo da história evolutiva das unidades taxonômicas operacionais das OTUs e conhecimento dos membros de famílias multigênicas e sua diversidade molecular (NAHUM & PEREIRA, 2008; ASLETT *et al.*, 2010; CUESTA-ASTROZ *et al.*, 2014; VALDIVIA *et al.*, 2015; MITCHELL, 2017; SCHOLTE *et al.*, 2017). Além disso, permite a predição funcional de genes e proteínas (DUFERNEZ *et al.*, 2006), entendimento da diversidade metabólica dos organismos (NAHUM *et al.*, 2009), estudos de filogeografia (MILES *et al.*, 2009), construção de códigos de barras de DNA (do inglês, *DNA barcoding*) (MUNCH *et al.*, 2008), entendimento da dispersão de epidemias e pandemias (SHEREEN *et al.*, 2020), acompanhamento da evolução de tumores (filooncologia) (SOMARELLI *et al.*, 2017), dentre várias outras funcionalidades.

A determinação dos membros de uma família multigênica pode ainda revelar subtipos de uma mesma enzima de interesse. Esse é um aspecto essencial quando se deseja inferir a história evolutiva de potenciais alvos de fármacos para o tratamento de doenças que necessitam de novas abordagens quimioterápicas. O ideal é que os candidatos à fármacos, tenham ação sob todos os componentes da família gênica/proteica, garantindo o efeito contra o agente etiológico da doença.

Informações sobre a filogenia das FeSODs dos tripanosomatídeos são raras na literatura. Nossa proposta de estudo foi reunir dados de sequências dos genes das FeSODs de *T. cruzi* e utilizá-las para reconstrução da história evolutiva dessas enzimas. Seguindo a premissa de que a atividade de um novo fármaco contra o *T. cruzi* deva idealmente exercer efeito sobre os genes homólogos do alvo proposto, nós realizamos a investigação da ação tripanocida de compostos que potencialmente interagem com todos os elementos da família dessas proteínas.

2. JUSTIFICATIVA

A quimioterapia da doença de Chagas apresenta desafios como a baixa eficácia de cura dos pacientes na fase crônica da doença, efeitos adversos provocados pelo BZ e NFX, a existência de cepas de *T. cruzi* naturalmente resistentes aos fármacos e a resistência cruzada entre o BZ e o NFX. Diante desse cenário, é essencial a pesquisa de novos alvos para o desenvolvimento de fármacos mais seguros e eficientes.

O sistema de defesa antioxidante nos tripanosomatídeos é um potencial alvo para quimioterapia. Ele é composto por um aparato enzimático capaz de lidar contra as espécies reativas de oxigênio resultantes da ação dos fármacos e do sistema imunológico dos hospedeiros. As FeSODs fazem parte desse sistema e já apresentam resultados promissores quando previamente testadas como alvos de novos compostos com potencial tripanocida. As SODs humanas não apresentam o ferro como grupo prostético, o que reforça a relevância das FeSODs como potenciais alvos durante a elaboração de novas estratégias quimioterápicas contra o *T. cruzi*. As FeSODs já foram descritas como genes essenciais em parasitos do gênero *Leishmania*. Em *T. cruzi*, elas estão mais expressas em populações resistentes ao BZ em comparação com populações suscetíveis, mostrando sua importância na defesa contra o BZ. O desbalanço dos níveis dos produtos reduzidos pelas enzimas leva ao estresse oxidativo, evidenciando a importância de ampliar seu conhecimento enquanto potenciais alvos de compostos contra o *T. cruzi*.

A filogenética pode auxiliar na identificação de membros de famílias gênicas e protéicas de potenciais alvos moleculares para candidatos a fármacos. Essas proteínas podem ter funções semelhantes e/ou relacionadas, podendo haver necessidade de atuação do composto em mais de um ou todos os membros da família.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Compreender a diversidade molecular das enzimas ferro-superóxido dismutase de cepas de *T. cruzi* sob uma perspectiva evolutiva.

3.2 Objetivos específicos

- Obter os genes codificadores das FeSODs.
- Reconstruir as relações filogenéticas das FeSODs.
- Pesquisar candidatos a fármacos/compostos que interagem com as FeSODs.
- Testar a atividade *in vitro* dos candidatos a fármacos contra o *T. cruzi*.

4. METODOLOGIA

4.1 Avaliação da FeSOD como membro de família multigênica

Sequências aminoacídicas das FeSODs de *T. cruzi*, foram obtidas através de uma busca avançada por proteínas no UniProt, versão 2017. Foram utilizados os campos *Protein Name* e *Organism* com as palavras “*superoxide dismutase*” e “*Trypanosoma cruzi*” respectivamente. A especificação do grupo prostético “*iron*” no campo “*Protein Name*” não foi utilizada, pois muitas SODs não estão depositadas com a descrição de seu grupo prostético. A escolha do UniProt para a seleção dos dados foi por ele ser um banco curado e com a maioria das informações necessárias para desenvolvimento dessa e de outras etapas do trabalho.

As sequências recuperadas foram utilizadas para busca de correspondências entre elas e códigos de famílias de domínios proteicos depositados no Pfam (Finn *et al.*, 2008). A arquitetura proteica das enzimas encontradas foi pesquisada a partir da submissão das sequências no campo “*Sequence search*” disponível na página inicial do Pfam.

No TriTrypDB (ASLETT *et al.*, 2010), os códigos Pfam foram usados para a busca da quantidade de genes codificadores de proteínas que contém os domínios em cada cepa de *T. cruzi*. Caso as cepas apresentem mais de um gene, o indicativo é de que a FeSOD pertence a uma família multigênica.

4.2 Predição das proteínas homólogas das FeSODs de *T. cruzi*

Os códigos dos domínios proteicos no Pfam encontrados no item anterior, foram usados para realização de uma busca avançada no UniProt para predição das proteínas homólogas das FeSODs de *T. cruzi* em proteomas preditos do parasito armazenados no banco. Essa verificação oferece uma noção da quantidade mínima de FeSODs homólogas no proteoma analisado. No entanto, é importante ressaltar que proteínas multidomínios podem compartilhar unidades estruturais idênticas ou semelhantes mesmo não possuindo qualquer relação de homologia. Esse fenômeno deve-se aos eventos de recombinação homóloga em processos de divisão celular, em que ocorre embaralhamento de regiões codificantes de domínios entre diferentes genes (*shuffling*).

4.3 Amplificação dos genes das FeSODs de *T. cruzi*

4.3.1 Desenho de iniciadores

O acesso à cada sequência aminoacídica específica de FeSODs de *T. cruzi* depositadas no UniProt, foi utilizado para a recuperação das sequências nucleotídicas correspondentes pelo *hyperlink* de intercâmbio do UniProt ao European Nucleotide Archive (ENA) (AMID *et al.*, 2020) ou do NCBI Reference Sequence Database (RefSeq) (O'LEARY *et al.*, 2016) nos casos em que o ENA não possuía a sequência em sua plataforma.

A partir daí, foram selecionadas apenas as sequências que possuem evidências experimentais associadas e publicadas. Esses foram os genes escolhidos para o desenho dos iniciadores das FeSODs, uma vez que eles foram caracterizados experimentalmente como FeSODs de *T. cruzi*.

No total, foram selecionadas 14 sequências gênicas, sendo 12 genes da FeSOD-A e dois da FeSOD-B. Não foram encontradas sequências de *T. cruzi* descritas como genes de FeSOD-C caracterizadas experimentalmente. As sequências foram alinhadas com o MUSCLE (EDGAR, 2004) do pacote MEGA X 10.1.8 (KUMAR *et al.*, 2018). O objetivo foi selecionar as regiões conservadas para confecção dos iniciadores.

A partir das sequências com identificação do tipo, foi possível desenhar iniciadores *forward* desde o códon de início (ATG) e iniciadores reversos que anelam desde o códon de parada para ambos os tipos de FeSOD. Adicionalmente, foram confeccionados pares de iniciadores que anelam em regiões internas dos genes em direção às extremidades 5' e 3' dos *amplicons* com o intuito de garantir melhor qualidade dessas regiões e permitir que o gene seja obtido em sua extensão mais completa possível. A tabela 1 mostra a sequência dos iniciadores

desenhados e características dos mesmos preditas com a ferramenta de estatísticas de iniciadores de PCR Sequence Manipulation Suite (disponível em: https://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html).

Tabela 1: Características dos iniciadores para amplificação dos genes de FeSOD-A e FeSOD-B de *T. cruzi*.

Gene	Sentido da fita	Sequência do iniciador (5'-3')	Conteúdo GC (%)	Temperatura de anelamento predita	Tamanho do iniciador
FeSOD-A	<i>Forward</i>	ATGTTGAGACGTGCGGTGAATATATC	42,3	56,4	26
	<i>Reverso</i>	TCAAGTAATCCGGCCGGCGGTTTTTC	56,0	61,0	25
FeSOD-B	<i>Forward</i>	ATGGTCTTCAGCATTCCCTCCGC	54,5	56,7	22
	<i>Reverso</i>	GTTCCACGTTCTTCCAGTTGAC	50,0	54,8	22
FeSOD-A (interno)	<i>Forward</i>	CCCTTGAGTCTGCTGTTACGGCC	60,8	61,0	23
	<i>Reverso</i>	TCCAACCCGAGCCAAAGTTATT	45,4	53,0	22
FeSOD-B (interno)	<i>Forward</i>	TTAACCACACGTTCTACTGGG	47,6	52,0	21
	<i>Reverso</i>	CAAGCCACGCCCAACCCGAG	70,0	60,0	20

4.3.2 Extração do DNA

A extração do DNA do sedimento dos parasitos selecionados para o estudo foi feita utilizando o protocolo de extração com fenol-clorofórmio desenvolvido por Sambrook e Russel em 2006. Primeiramente os parasitos foram lavados em solução PBS 1 %. Em seguida foram ressuspendidos em tampão de extração contendo 100 mM de Tris-HCl, 5 mM EDTA, 20 mM de NaCl e 10 % de SDS, pH 8,0 e incubado com 5 µL de proteinase K (10 mg/mL) e 1 µL de RNase (20 mg/mL) por 2 horas a 37 °C. O DNA foi extraído com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e precipitado pela adição de etanol 100 % (v/v). Esse material genético precipitado foi lavado duas vezes utilizando etanol 70 % (v/v) e foi ressuspendido em água DNase Free aquecida a 37 °C. Por fim, o equipamento Nanodrop foi utilizado para determinação da concentração obtida de DNA por espectrofotometria (SAMBROOK & RUSSEL, 2006).

4.3.3 Reação de PCR

Foram amplificados os genes das FeSODs de 35 cepas de *T. cruzi*, disponíveis no acervo do laboratório (Tabela 2).

Tabela 2: Informações das cepas e clones de *T. cruzi* utilizados no estudo.

Sus^a, susceptibilidade *in vivo* ao BZ e NFX; S: susceptível; R: resistente; MR: resistência média ND- não determinada.

*: local de origem apenas com especificação do país, sem informação de região com maior especificação.

DTU	Cepa	Origem	Hospedeiro	Família do Hospedeiro	Sus ^a	Referência - Sus
TcI	2137	Rio Grande do Norte	<i>Homo sapiens</i>	Hominidae	ND	ND
TcI	2549	Rio Grande do Norte	<i>Homo sapiens</i>	Hominidae	ND	ND
TcI	Colombiana	Colômbia*	<i>Homo sapiens</i>	Hominidae	R	FILARDI & BRENER, 1987
TcI	Quaraizinho	Rio Grande do Sul	<i>Triatoma infestans</i>	Reduviidae	S	FILARDI & BRENER, 1987
TcI	RS-21	Rio Grande do Sul	<i>Panstrongylus megistus</i>	Reduviidae	S	MURTA <i>et al.</i> , 1998
TcI	SC28	Santa Catarina	<i>Didelphis marsupialis</i>	Didelphidae	R	FILARDI & BRENER, 1987
TcII	Berenice	Minas Gerais	<i>Homo sapiens</i>	Hominidae	S	FILARDI & BRENER, 1987
TcII	Ernane	Goiás	<i>Homo sapiens</i>	Hominidae	S	FILARDI & BRENER, 1987
TcII	Gilmar	Minas Gerais	<i>Homo sapiens</i>	Hominidae	S	FILARDI & BRENER, 1987
TcII	MR	Rio Grande do Sul	<i>Triatoma infestans</i>	Reduviidae	S	FILARDI & BRENER, 1987
TcII	São Felipe	Bahia	<i>Triatoma infestans</i>	Reduviidae	S	FILARDI & BRENER, 1987
TcII	VL-10	Minas Gerais	<i>Homo sapiens</i>	Hominidae	R	FILARDI & BRENER, 1987
TcII	Y	São Paulo	<i>Homo sapiens</i>	Hominidae	MR	FILARDI & BRENER, 1987
TcIII	C00113	Goiás	<i>Monodelphis domestica</i>	Didelphidae	ND	ND
TcIII	C00370	Pará	<i>Rhodnius pictipes</i>	Reduviidae	ND	ND
TcIII	C00566	Mato Grosso do Sul	<i>Dasypus novemcinctus</i>	Dasypodidae	ND	ND
TcIII	PEBA18	Rio Grande do Norte	<i>Euphractus sexcinctus</i>	Chlamyphoridae	ND	ND
TcIII	PL0213	Rio Grande do Norte	<i>Panstrongylus lutzi</i>	Reduviidae	ND	ND
TcIII	RN19	Rio Grande do Norte	<i>Panstrongylus lutzi</i>	Reduviidae	ND	ND
TcIII	SM76	Rio Grande do Norte	<i>Homo sapiens</i>	Hominidae	ND	ND
TcIV	AM64	Amazonas	<i>Homo sapiens</i>	Hominidae	MR	TESTON <i>et al.</i> , 2013
TcIV	C00041	Mato Grosso do Sul	<i>Thrichomys pachyurus</i>	Echimyidae	ND	ND
TcIV	C00471	Mato Grosso do Sul	<i>Oecomys mamorae</i>	Cricetidae	ND	ND

Tabela 2: Informações das cepas e clones de *T. cruzi* utilizados no estudo. Continuação

Sus^a, susceptibilidade *in vivo* ao BZ e NFX; S: susceptível; R: resistente; MR: resistência média ND- não determinada.

*: local de origem apenas com especificação do país, sem informação de região com maior especificação.

DTU	Cepa	Origem	Hospedeiro	Família do Hospedeiro	Sus ^a	Referência - Sus
TcIV	C00524	Mato Grosso do Sul	<i>Triatoma</i> spp.	Reduviidae	ND	ND
TcIV	C00526	Mato Grosso do Sul	<i>Triatoma</i> spp.	Reduviidae	ND	ND
TcIV	C00601	Espírito Santo	<i>Triatoma vitticeps</i>	Reduviidae	ND	ND
TcV	3253	Rio Grande do Sul	<i>Homo sapiens</i>	Hominidae	ND	ND
TcV	Bug2149cl10	Rio Grande do Sul	<i>Triatoma infestans</i>	Reduviidae	R	TOLEDO <i>et al.</i> , 2003
TcV	JM	Minas Gerais	<i>Homo sapiens</i>	Hominidae	S	FILARDI & BRENER, 1987
TcVI	Buriti	Rio Grande do Sul	<i>Triatoma infestans</i>	Reduviidae	S	FILARDI & BRENER, 1987
TcVI	CL	Rio Grande do Sul	<i>Triatoma infestans</i>	Reduviidae	S	FILARDI & BRENER, 1987
TcVI	CL Brener clone	Rio Grande do Sul	<i>Triatoma infestans</i>	Reduviidae	S	FILARDI & BRENER, 1987 ZINGALES <i>et al.</i> , 1997
TcVI	FL	Rio Grande do Sul	<i>Triatoma infestans</i>	Reduviidae	S	FILARDI & BRENER, 1987
TcVI	Luna	Argentina*	<i>Homo sapiens</i>	Hominidae	S	FILARDI & BRENER, 1987
TcVI	RS-12	Rio Grande do Sul	<i>Homo sapiens</i>	Hominidae	ND	ND

A reação de PCR para as enzimas foi feita com 20 µl do Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen), 2 µl de cada iniciador (10 ng/µl) e 2 µl de amostra de DNA (10 ng/µl), com volume final de 26 µl. A amplificação foi realizada com desnaturação a 94° durante 5 minutos seguida de 30 ciclos de: desnaturação à 94° (30 segundos); anelamento à 55° (30 segundos); extensão à 72° (um minuto). Por fim, os produtos passaram por uma extensão final condicionada à 72° durante 5 minutos. O processo foi programado no termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Foram geradas três replicatas biológicas (de cada gene nas 35 cepas) a partir de PCRs realizadas em dias diferentes com os iniciadores *forward* e reverso. Os produtos amplificados foram sequenciados de acordo com o mesmo par de iniciadores da etapa de PCR. Uma quarta PCR foi realizada com os mesmos iniciadores *forward* e reverso para sequenciamento dos produtos utilizando os iniciadores que anelam em regiões internas (Tabela 1).

Os produtos de PCR foram purificados com o QIAquick® PCR purification Kit (Qiagen) e submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed™ (Biotium). As imagens dos géis foram geradas no equipamento ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare).

4.4 Sequenciamento dos genes

Os genes foram sequenciados pelo método de Sanger (SANGER *et al.*, 1977) na Plataforma de Sequenciamento do Instituto René Rachou. As placas de sequenciamento foram preparadas com meio microlitro dos iniciadores *forward* e reverso separadamente, um microlitro de DNA e seis microlitros de água livre de DNase e RNase para melhorar a eficiência da reação.

Primeiramente foi feito o sequenciamento (com os iniciadores *forward* e reverso) a partir dos produtos de PCR das três réplicas biológicas. Duas dessas três réplicas biológicas foram sequenciadas novamente da mesma forma (replicatas técnicas). Esse segundo sequenciamento foi feito para aumentar a quantidade de fitas utilizadas para a montagem das sequências consenso, a fim de aumentar a confiabilidade das bases indicadas em cada posição e auxiliar na identificação de erros de sequenciamento. O quarto produto de PCR foi sequenciado duas vezes a partir dos iniciadores internos, gerando então uma réplica biológica e uma técnica. Essa foi uma estratégia de melhorar a qualidade do sequenciamento das extremidades dos genes e enriquecer o processo de montagem das sequências consenso.

4.5 Montagem dos genes

A montagem para cada gene foi feita separadamente com as 14 fitas (*forward* e *reverse*) geradas no sequenciamento das quatro réplicas biológicas e três técnicas de cada cepa. O pacote utilizado foi o Phred-Phrap-Consed (MACHADO *et al.*, 2011), com *pipeline* desenvolvido com *scripts* implementados em Perl.

O software Phred atribui um valor de qualidade para cada base sequenciada que retrata a probabilidade de erro em escala logarítmica, sendo Q o valor de qualidade e P_e a probabilidade de erro de uma base específica:

$$Q = -10 \log_{10}(P_e)$$

Tem sido demonstrado que a qualidade Phred apresenta boa acurácia e consequentemente alto poder de discernir bases como verdadeiras ou errôneas.

O Phrap é o programa de montagem das sequências. Ele utiliza uma combinação de qualidade entre as leituras (no caso as fitas de cada gene em cada cepa separadamente) para formar um ou mais *contigs*, podendo ou não utilizar toda a base de dados fornecida para a montagem de cada gene.

O Consed é um visualizador e editor da montagem. As bases do(s) *contig(s)* gerado(s) das fitas utilizadas para a montagem são apresentadas em diferentes tons de cor (do branco ao preto) que especificam a qualidade *Phred* (EWING *et al.*, 1998) (Tabela 3), o que permite a edição do *contig* para corte de regiões com baixa qualidade ou que intuitivamente podem não fazer parte da sequência de interesse.

Tabela 3: Probabilidade de erro e acurácia de bases por escala de qualidade *Phred*.

Qualidade Phred	Probabilidade de erro	Acurácia da base
10	1 em 10	90%
20	1 em 100	99%
30	1 em 1.000	99.9%
40	1 em 10.000	99.99%
50	1 em 100.000	99.999%

Quando mais de um *contig* foi construído para um determinado gene, optou-se pela escolha do que foi gerado a partir de uma quantidade maior de fitas (que frequentemente

apresentam maior qualidade). Por fim, os *contigs* escolhidos e editados foram salvos em um único arquivo multi FASTA para FeSOD-A e outro para FeSOD-B.

4.6 Determinação do número de cópias dos genes das FeSODs de *T. cruzi*

Com o objetivo de determinar o número de cópias dos genes de FeSOD-A, FeSOD-B e FeSOD-C no genoma de *T. cruzi*, foi feita uma colaboração com a Dra. Daniella Bartholomeu e o Prof. Anderson Coqueiro dos Santos, ambos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG.

As análises foram realizadas com todas as sequências nucleotídicas utilizadas para as reconstruções filogenéticas deste estudo. Para a predição do número de cópias do gene da FeSOD-C, foram utilizadas 18 sequências do TriTrypDB que potencialmente codificam esse tipo de FeSOD.

Primeiramente, foi verificada a fase de leitura (do inglês *open reading frame* ou ORF), que quando necessário, foi corrigida para a primeira fase de leitura senso (5'-3'). Todas as sequências foram utilizadas como arquivo de entrada de um programa (não publicado) para a pesquisa de similaridade entre as sequências e regiões do genoma do clone CL Brener (não publicado). O genoma foi obtido pela tecnologia de sequenciamento PacBio Technology (WEI & ZHANG, 2018) combinada com a tecnologia de Illumina HiSeq 2000 (LIU *et al*, 2011). O programa estende a sequência nucleotídica até o próximo *stop codon* de acordo com correspondências entre regiões do genoma e entre a sequência de aminoácidos correspondente para a checagem de *stop codons* internos. Dessa forma, o número de cópias de cada proteína foi obtido de acordo com o *match* entre as sequências e o genoma.

4.7 Bases de dados para reconstrução das árvores filogenéticas das FeSODs

A reconstrução das árvores foi realizada para duas bases de dados diferentes, selecionadas de acordo com o objetivo e hipótese a ser testada. Os conjuntos de dados utilizados, incluíram as 35 sequências de genes sequenciados no presente estudo (um de genes de FeSOD-A e outro de genes de FeSOD-B). A fim de aumentar a base de dados e quantidade de informações relevantes para anotação das árvores, foram incluídas sequências obtidas através do UniProt (pelo *link* de intercâmbio do UniProt ao ENA e RefSeq) que possuem evidências experimentais associadas publicadas (Tabela 4). A ideia de incluir essas sequências foi permitir que fossem realizadas inferências tanto filogenéticas quanto de propriedades compartilhadas ou semelhantes entre os genes sequenciados e recuperados dos bancos de dados.

O objetivo foi determinar as relações filogenéticas entre os genes do parasito e com isso verificar a presença de subtipos diferentes de cada tipo de FeSOD e padrões cladísticos por DTU, localização geográfica e hospedeiro em que o parasito foi isolado.

A primeira hipótese testada nesses casos foi a obtenção de árvores que indicam a existência de diferentes variantes funcionais de ambas as enzimas. Essa hipótese foi elaborada com base em dados da literatura que mostram a enorme biodiversidade molecular que esses genes apresentam em diferentes espécies e dentro de uma mesma espécie. A segunda hipótese é a inexistência de clados compostos apenas por genes de cepas de mesma DTU, origem geográfica e hospedeiro. Em outras palavras, não é esperado que existam congruências por alguma dessas características, entre sequências que compartilham o mesmo ancestral comum mais recente. Essa hipótese foi pensada devido à inexistência de evidências de que as FeSODs possuem ancestralidade comum entre cepas de mesma DTU, entre parasitos de uma determinada localidade e parasitos residentes de hospedeiros específicos.

Tabela 4: Informações sobre as sequências selecionadas para as reconstruções filogenéticas do estudo.

Cepa/Clone	Tipo	UniProt ID	ENA ID	RefSeq ID	PDB ID	Referência	Tamanho (nt)	^a Sus
CL Brener	FeSOD-A	Q4DCQ3	EAN90306.1	XM_807064	4DVG 4H3E	MARTÍNEZ <i>et al.</i> , 2014	702	S
Tulahuen C2	FeSOD-A	O02615	AAC47548.2	NA	NA	PHAN <i>et al.</i> , 2015	636	S
Y (clone 4)	FeSOD-A	Q2TJ60	AAX84933.1	NA	NA	ISMAIL <i>et al.</i> , 1997	637	S
Y (clone 16)	FeSOD-A	Q2TJ60	AAX84936.1	NA	NA		637	R
17LER	FeSOD-A	Q2TJ65	AAX84930.1	NA	NA	NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2006	637	R
17WTS	FeSOD-A	Q2TJ65	AAX84931.1	NA	NA		637	S
Barra Seca	FeSOD-A	Q2TJ65	AAX84932.1	NA	NA		637	S
YUYU	FeSOD-A	Q2TJ65	AAX84938.1	NA	NA		637	R
CL Brener	FeSOD-A	Q2TJ61	AAX84934.1	NA	NA	NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2006	637	S
JA	FeSOD-A	Q2TJ61	AAX84935.1	NA	NA		637	S
São Felipe	FeSOD-A	Q2TJ61	AAX84937.1	NA	NA		637	S
VL-10	FeSOD-A	Q2TJ61	AAX84939.1	NA	NA		637	R
CL Brener	FeSOD-B	Q4DI29	EAN92179.1	XM_808937	2GPC	BACHEGA <i>et al.</i> , 2009 MARTÍNEZ <i>et al.</i> , 2014	588	S
Tulahuen C2	FeSOD-B	O02616	AAC47549.1	NA	NA	ISMAIL <i>et al.</i> , 1997	588	S

NA - not applicable; ^aSus, susceptibilidade *in vivo* ao BZ e NFX; S: susceptível; R: resistente.

4.8 Alinhamento das sequências

O pacote MEGA X 10.1.8. foi utilizado para realizar o alinhamento de cada conjunto de sequências para cada árvore através do MUSCLE. Cada alinhamento foi salvo no formato FASTA e editado manualmente para eliminação das colunas das extremidades contendo *gaps*.

4.9 Escolha do modelo evolutivo

O programa jModelTest (DARRIBA *et al.*, 2012) foi utilizado para elucidar o modelo que melhor explica os dados de cada alinhamento. A escolha foi baseada na comparação da probabilidade dos modelos testados de acordo com o Akaike Information Criterion (AIC) (AKAIKE, 1974).

É importante mencionar que a intenção é inserir em árvores obtidas por inferência Bayesiana, valores de apoio estatístico tanto de máxima verossimilhança quanto de inferência Bayesiana para a mesma base de dados. Para isso, as árvores obtidas pelos diferentes métodos devem ser reconstruídas utilizando-se o mesmo modelo evolutivo e abordagens de variação de taxas de substituições nucleotídicas quando indicado. Isso permite que as árvores de mesma base de dados sejam comparáveis.

Assim sendo, o modelo indicado para a inferência filogenética das FeSODs do tipo A foi o Kimura 2-parâmetros e para FeSOD-B o HKY85. Para os dois alinhamentos de entrada, utilizamos a opção de estimativa da proporção de sítios invariáveis.

O Kimura 2-parâmetros é um dos modelos matemáticos que utiliza distâncias. Ele leva em consideração eventos de substituição por transição e transversão. A troca de uma purina (adenina ou guanina) por outra purina ou pirimidina (timina ou citosina) por outra pirimidina caracteriza uma transição. A transversão é a troca de uma purina por uma pirimidina ou vice-versa. Sequências homólogas costumam apresentar a razão entre transição e transversão (transição/transversão ou P/Q) maior do que 0,5. Significa que a quantidade de transições costuma ser maior que a quantidade de transversões. Isso acontece porque as purinas possuem dois anéis de carbono e as pirimidinas apenas um. Logo, as substituições de bases com mesma classificação não abalam a estrutura do DNA tanto quanto as trocas entre bases de diferentes classificações e passam mais facilmente pelo sistema de reparo. Adicionalmente, a probabilidade das transversões propiciarem a troca do aminoácido é maior, o que oportuniza sua eliminação durante o processo evolutivo. A troca do aminoácido acontece mais frequentemente entre aminoácidos com propriedades bioquímicas semelhantes (hidrofobicidade, comprimento, acidez/basicidade e etc). O modelo Kimura 2-parâmetros

considera esses aspectos para inferir, partindo diretamente dos dados, a troca de um nucleotídeo “original” pelos demais (MATIOLI & FERNANDES, 2012).

O modelo HKY85 visa estimar a divergência de dados de sequenciamento de DNA utilizando uma abordagem de relógio molecular. O modelo estatístico considera que cada sítio do alinhamento de sequências pode ser modificado de forma homogênea e independente dos demais sítios. Assim como o Kimura 2-parâmetros, esse modelo também considera a razão entre as taxas de transição e transversão, além de considerar a frequência de cada nucleotídeo na base de dados (HASEGAWA *et al.*, 1985).

4.10 Reconstrução das árvores filogenéticas das FeSODs pelo método de máxima verossimilhança

O software PhyML foi utilizado para a obtenção das árvores de máxima verossimilhança. Nesses casos, os valores de apoio estatístico dos nós das árvores foram estimados através da reconstrução de 1000 pseudoréplicas de *bootstrap* e computados pelo *approximate Likelihood-Ratio Test* (aLRT) (GUINDON & GASCUEL, 2003; ANISIMOVA & GASCUEL, 2006).

4.11 Reconstrução das árvores filogenéticas das FeSODs pelo método de inferência Bayesiana

A inferência Bayesiana foi realizada no MrBayes 3.2.7 em quatro etapas principais, são elas: leitura do arquivo de entrada, especificação do modelo evolutivo, execução da inferência e sumarização dos resultados. Os arquivos de alinhamento (mesmos utilizados para as árvores de máxima verossimilhança), foram convertidos do formato FASTA para o formato NEXUS através da ferramenta ALTER (GLEZ-PEÑA *et al.*, 2010).

O MrBayes executa duas sessões independentes que iniciam gerando árvores aleatórias, que portanto, terão um certo grau de divergência entre si. As gerações passam a ficar parecidas após convergirem e o esperado é que o desvio padrão médio das frequências divididas (do inglês, *average standard deviation of split frequencies* ou ASDSF) fique abaixo de 0.01. A partir desse ponto, o programa oferece as opções de continuar ou não com a inferência. Caso a diferença entre as probabilidades das duas sessões seja pequena, não é necessário continuar a inferência.

Os resultados são expressos com um cladograma (com os valores de apoio estatístico; um filograma consensual (com os comprimentos dos ramos) e uma lista de árvores geradas com os respectivos valores de probabilidade acumulada (P) e valor de probabilidade posterior (p).

Foram descartadas 25% das árvores amostradas inicialmente e que, portanto, estão mais distantes do espaço amostral da resposta ótima de topologia.

Após a inferência, foi verificado se o ASDSF ficou menor que 0,01 (reflete que as árvores das duas sessões independentes se tornam cada vez mais semelhantes umas das outras), se o tamanho estimado das amostras (do inglês *estimated sample size* ou ESS) foi maior que 100 (indicativo de que os parâmetros não foram subamostrados) e se o fator de redução de escala potencial (do inglês *potential scale reduction factor* ou PSRF) ficou próximo de 1 (indicativo de que as gerações convergiram). Para otimizar o PSRF, foram realizadas análises de MCMC (uma cadeia fria e três quentes) com 10.000.000 de gerações amostradas a cada 100 gerações. Os parâmetros utilizados para cada base de dados estão apresentados na figura 4.

As árvores reconstruídas foram visualizadas e editadas no *software* Figtree (tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree). A árvore foi enraizada com o *midpoint* do Figtree. Esse é um método de inferência da posição de enraizamento que assume que a raiz está no ponto médio da maior distância entre as sequências, apresentada na árvore. No entanto, o *midpoint* realiza uma inferência limitada, uma vez que considera que a taxa de evolução entre os é idêntica entre os elementos da árvore.

Figura 4: *Base block* para reconstrução das árvores por inferência Bayesiana

As opções em cinza são específicas para definir o modelo de cada base de dados. As árvores de FeSOD-A foram reconstruídas com a primeira opção apresentada em duas linhas (configuração para o modelo Kimura 2-parâmetros) e as árvores de FeSOD-B foram reconstruídas com a segunda opção em uma só linha (configuração para o modelo HKY85).

```
MrBayes > execute alignment.nex
MrBayes > Showmatrix
MrBayes > set autoclose=yes nowarn=yes
#MrBayes > Lset nst=2 rates=propinv[FeSOD-A genes]
#MrBayes > prset statefreqpr=fixed(equal) [FeSOD-A genes]
#MrBayes > Lset nst=2 rates=propinv [FeSOD-B genes]
MrBayes > Showmodel
MrBayes > mcmc ngen=10000000 printfreq=1000 samplefreq=100
nchains=4 temp=0.2 checkfreq=50000 diagnfreq=1000 stopval=0.01
stoprule=yes savebrlens=yes
MrBayes > sumt relburnin=yes burninfrac=0.25 contype=halfcompat
MrBayes > sump relburnin=yes burninfrac=0.25
```

Fonte: Hickson *et al.*, 2022.

4.12 Pesquisa de compostos que interagem com as FeSODs

Para agregar conhecimento sobre o potencial dos diferentes genes das FeSODs como alvo de fármacos contra o *T. cruzi*, realizamos abordagens computacionais e experimentais em bancada. A ideia foi utilizar a diversidade de genes das FeSODs elucidados nas filogenias como objeto de busca por substâncias químicas que de alguma maneira interagem potencialmente com esses alvos. O ideal é que todos os genes apresentem essa interação com as substâncias para propormos o potencial quimioterápico das drogas encontradas. A pesquisa foi realizada com a ferramenta de busca de candidatos às drogas do DrugBank. O DrugBank é um banco de dados exclusivo de bioinformática e quimioinformática que combina propriedades químicas e farmacológicas de agentes com informações estruturais e de sequência associadas a potenciais vias-alvo (WISHART *et al.*, 2018).

4.13 Ensaios *in vitro* de compostos contra o *T. cruzi*

Compostos encontrados no item anterior foram submetidos à testagem *in vitro* contra formas amastigotas e tripomastigotas do parasito (formas relevantes para a infecção humana) e

a determinação da toxicidade sobre células L929 (fibroblastos de camundongos) de acordo com o protocolo desenvolvido por Romanha e colaboradores (Romanha *et al.*, 2010). Os ensaios foram realizados utilizando-se o meio *Roswell Park Memorial* (RPMI) suplementado com glutamina (2 mM) e soro fetal bovino (10%).

O ensaio tripanocida foi realizado com a utilização da cepa Tulahuen mutante de *T. cruzi* que expressa a enzima beta-galactosidase de *Escherichia coli* (BUCKNER *et al.*, 1996). Tripomastigotas dessa cepa foram utilizadas para infectar células L929 (fibroblastos de camundongos) em uma proporção de 10 parasitos para cada célula. O processo de infecção foi interrompido após duas horas através da substituição do meio de cultura e as células infectadas foram incubadas durante 48 horas à 37°C e 5% de CO₂ (ROMANHA *et al.*, 2010).

Após esse período, o meio de cultura foi substituído por meio novo, além compostos em concentrações decrescentes, a partir de 1.000 µM, até chegar ao IC₅₀ (concentração do composto capaz de inibir o crescimento parasitário em 50 %). Após 96 horas de incubação, foi adicionado o substrato *chlorophenol red-beta-D-galactopyranoside* (CPRG) e a placa foi incubada à 37°C para leitura (realizada após 16-20 horas) no espectrofotômetro Devices com um filtro de 570nm. O benzonidazol no seu IC₅₀ (1 µg/mL = 3,81 µM) foi utilizado como controle positivo. Os resultados foram expressos como a porcentagem de inibição do crescimento parasitário.

Os compostos com atividade tripanocida foram testados contra as células L929 para determinação da citotoxicidade (CC- concentração citotóxica) sobre células de vertebrados (ROMANHA *et al.*, 2010). A viabilidade das células tratadas foi determinada com o indicador de viabilidade celular alamarBlue™. As amostras foram testadas em concentrações crescentes a partir do IC₅₀ sobre o parasito. Essa etapa foi feita com a mesma quantidade de células, tempo de desenvolvimento celular e tempo de exposição aos compostos usados no ensaio da beta-galactosidase. Após a adição do alamarBlue™, a placa foi incubada durante seis horas para leitura à 570 e 600 nm. Os resultados foram expressos através da diferença no percentual de redução entre células tratadas e células não tratadas. O Índice de seletividade (do inglês, *selectivity index* - SI) foi calculado pela razão do CC₅₀ dos compostos sobre as células L929 pelo IC₅₀ encontrado sobre o *T. cruzi*. Apenas compostos que apresentarem $IS \geq 50$ são recomendados para testes *in vivo*.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da FeSOD como membro de família multigênica

Foram encontradas 106 sequências aminoacídicas de FeSOD de *T. cruzi* no UniProt. As correspondências entre elas e dados do Pfam, mostraram arquiteturas proteicas compostas pelos domínios PF00081 (N-terminal) e/ou PF02777 (C-terminal) nesta ordem.

As proteínas que apresentaram apenas um dos domínios encontrados, podem realmente apresentarem essa estrutura diferenciada ou estarem com o depósito da sequência parcial de aminoácidos. Outra possibilidade é a ocorrência de mutações *nonsense*, resultando em códons de paradas no meio do gene, gerando proteínas truncadas com baixa ou nenhuma atividade. Inserções ou deleções de nucleotídeos podem alterar a ORF, podendo causar efeitos deletérios nos genes. As bases nitrogenadas possuem isomeria dinâmica, sendo alguns tipos de tautomeria um causador do emparelhamento incorreto de bases ou não emparelhamento. Lesões nas bases nitrogenadas causadas por espécies reativas de oxigênio também podem levar a um emparelhamento incorreto entre os pares de bases. Essas podem ser algumas explicações para FeSODS que sofreram perda total ou parcial da atividade contra o estresse oxidativo.

A estrutura do domínio relativo ao código PF00081 é composta por duas hélices em um *alpha-hairpin* longo antiparalelo. Já a estrutura do domínio de código PF02777 é uma mistura de alfa hélices e folhas beta. O Pfam não possui uma descrição específica de funções associadas aos domínios.

Os códigos encontrados foram utilizados separadamente como padrão de busca do TriTrypDB. O propósito dessa busca foi obter a quantidade de sequências gênicas da FeSOD que codificam proteínas com os domínios em questão em diferentes cepas de *T. cruzi* (Tabela 5).

Tabela 5: Número de genes que codificam os domínios PF00081 e PF02777 das FeSODs de *T. cruzi*.

Domínios do Pfam: PF00081 (alfa-hairpin) e/ou PF02777 (C-terminal) identificados no TriTrypDB.

Cepa/Clone	PF00081	PF02777	PF00081 e PF02777	Sequências analisadas
Brazil A4	0	2	5	7
Clone CL Brener Esmeraldo-like/ Non-Esmeraldo-like	0	4	9	13
Dm28c 2014	0	1	2	3
Dm28c 2017	0	2	7	9
Dm28c 2018	0	2	7	9
Marinkellei strain B7	0	2	2	4
Sylvio X10/1-2012	0	1	4	5
TCC	0	2	12	14
Y C6	0	1	8	9

O fato das cepas apresentarem mais de um gene que codifica proteínas com os domínios em questão, é um indicativo de que a FeSOD pertence a uma família multigênica. A diferença de quantidade de genes em cada cepa pode ser devido a informações incompletas apresentadas pelo banco ou podem ser erros nos dados. Mas também existe a possibilidade dessas diferenças serem características de biodiversidade molecular entre as cepas ou consequência da intervenção de eventos evolutivos associados aos genes.

5.2 Predição das proteínas homólogas das FeSODs de *T. cruzi*

A utilização dos códigos dos domínios das FeSODs (PF02777 e PF00081) para predição das proteínas homólogas foi realizada em três proteomas preditos de *T. cruzi* disponíveis no UniProt. A busca com ambos os domínios retornou nove proteínas no clone CL Brener UP000002296 (EL-SAYED *et al.*, 2005), 11 na cepa TCC UP000246078 e sete em Dm28c UP000246121 (BERNÁ *et al.*, 2018). Todas as proteínas encontradas estão descritas como superóxido dismutases. Os resultados reforçam a existência de diversos homólogos em um mesmo proteoma predito.

Assim como na busca com as sequências gênicas (Tabela 5), a pesquisa apenas com o domínio PF00081 mostra que não existem proteínas apenas com esses domínios nos proteomas analisados. Porém, a busca apenas com PF02777 retorna quatro, dois e uma proteína a mais nos três proteomas, respectivamente. Esses resultados e a quantificação dos genes codificadores de FeSODs nas diferentes cepas apresentados na tabela 5, reforçam a existência de proteínas que possuem apenas o domínio C-terminal, o que pode estar associado com algum processo evolutivo envolvido.

5.3 Determinação do número de cópias dos genes das FeSODs em *T. cruzi*

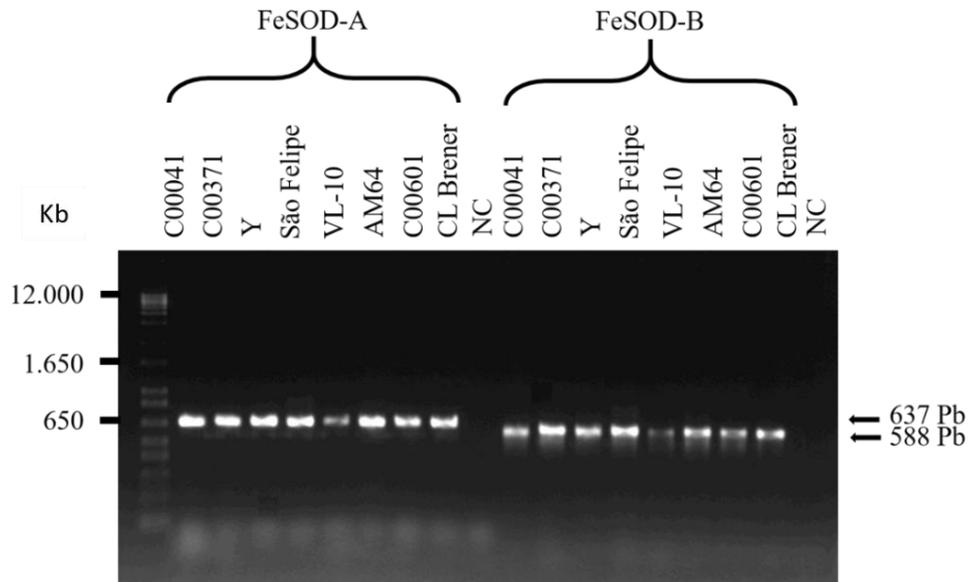
A correspondência entre as sequências do gene FeSOD e o genoma do clone de *T. cruzi* CL Brener (Anderson Coqueiro dos Santos, comunicação pessoal) revelou a presença de duas cópias do gene de FeSOD-A e quatro cópias dos genes de FeSOD-B. As sequências desses dois tipos de FeSODs diferiram principalmente pela presença de uma extensão na extremidade 5' no gene FeSOD-A, que está ausente no gene FeSOD-B. As cópias do gene de FeSOD-A estão localizadas em dois *scaffolds* diferentes: TcBrS006 (posições: 610002-610703) e TcBrS020 (649023-649724) com alta similaridade entre si. Por outro lado, as cópias do gene FeSOD-B foram encontradas em quatro *scaffolds* diferentes: TcBrS024 (375771-376394), TcBrS074 (371524-372111), TcBrS110 (279843-280466) e TcBrS188 (30050-30637). Em TcBrS024 e TcBrS110, observamos genes com alta similaridade e maior comprimento na extremidade 3' em comparação com as sequências TcBrS074 e TcBrS188, que por sua vez, também são altamente semelhantes entre si. Com relação à FeSOD-C, foram encontradas duas cópias do gene no *scaffold* TcBrS091 (215034-216071 e 219697-220734) e duas outras cópias no *scaffold* TcBrS112 (47508-48542 e 52180-53214).

5.4 Obtenção dos genes das FeSODs de *T. cruzi*

Os produtos da PCR dos genes das FeSODs foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed™ (Biotium). De acordo com o padrão de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), a posição das bandas um pouco acima da banda padrão de 650 pares de bases (pb) confirmaram o tamanho esperado de 637 pb para FeSOD-A e 588 pb para FeSOD-B. A figura 5 mostra as bandas de FeSOD-A e FeSOD-B de oito cepas do estudo.

Figura 5: Gel de agarose corado com GelRed mostrando as bandas de FeSODs de oito cepas do estudo.

Eletroforese em gel de agarose 1% dos fragmentos obtidos por amplificação da sequência codificante da FeSOD-A e da FeSOD-B em diferentes cepas de *T. cruzi*. Padrão de massa molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).



Fonte:

Hickson *et al.*, 2022.

Após o sequenciamento desses produtos de PCR, foram geradas as sequências consenso das réplicas de cada tipo da enzima em cada cepa estudada. Os *contigs* gerados foram editados para melhorar a qualidade do gene. Bases com baixa qualidade presentes nas extremidades foram deletadas e fitas em sentido *anti-senso* foram corrigidas. As características das sequências consenso estão apresentadas na tabela 6.

Tabela 6: Características da montagem dos genes de FeSOD-A e e FeSOD-B em cada cepa do estudo.

Cepa	Leituras (fitas) utilizadas FeSOD-A	Tamanho do consenso FeSOD-A	Leituras (fitas) utilizadas FeSOD-B	Tamanho do consenso FeSOD-B
2137	14	625	14	563
2549	14	625	14	574
3253	14	615	13	524
AM64	12	612	14	561
Berenice	14	610	14	528
Bug2149cl10	14	608	14	530
Buriti	14	612	14	539
C00041	14	610	14	560
C00113	12	608	14	534
C00370	14	636	14	538
C00471	14	610	14	563
C00524	13	634	14	518
C00526	14	636	14	558
C00566	14	636	12	562
C00601	14	609	14	563
CL	14	636	14	558
CL_Brener	14	611	14	534
Colombiana	14	609	14	537
Ernane	14	613	14	529
FL	14	630	14	573
Gilmar	13	623	14	534
JM	14	636	14	537
Luna	14	635	14	534
MR	13	623	14	547
PEBA18	14	624	14	531
PL0213	14	634	14	560
Quaraizinho	14	611	14	552
RN19	14	636	14	515
RS-12	14	633	14	559
RS-21	14	634	14	526
São Felipe	14	595	14	531
SC28	14	611	14	562
SM76	14	634	14	557
VL-10	7	589	10	565
Y	14	610	14	530

5.5 Reconstrução das árvores filogenéticas das FeSODs

O alinhamento dos 35 genes sequenciados para cada tipo de FeSOD foi editado para eliminação de sítios ricos em *gaps* presentes nas extremidades e para padronização do tamanho das sequências. Essa edição é importante para garantir que a topologia das árvores não seja afetada por discordâncias entre as extremidades das sequências. Mesmo após as correções, o total de sítios de cada alinhamento foi bem representativo comparado ao tamanho aproximado dos genes (637 pb para FeSOD-A e 588 pb para FeSOD-B).

A quantidade de sítios conservados foi muito maior comparado aos sítios variáveis. O número de sítios informativos parcimoniosos em cada alinhamento foi baixo. Essas características evidenciam a alta conservação entre cada tipo das FeSODs de *T. cruzi*.

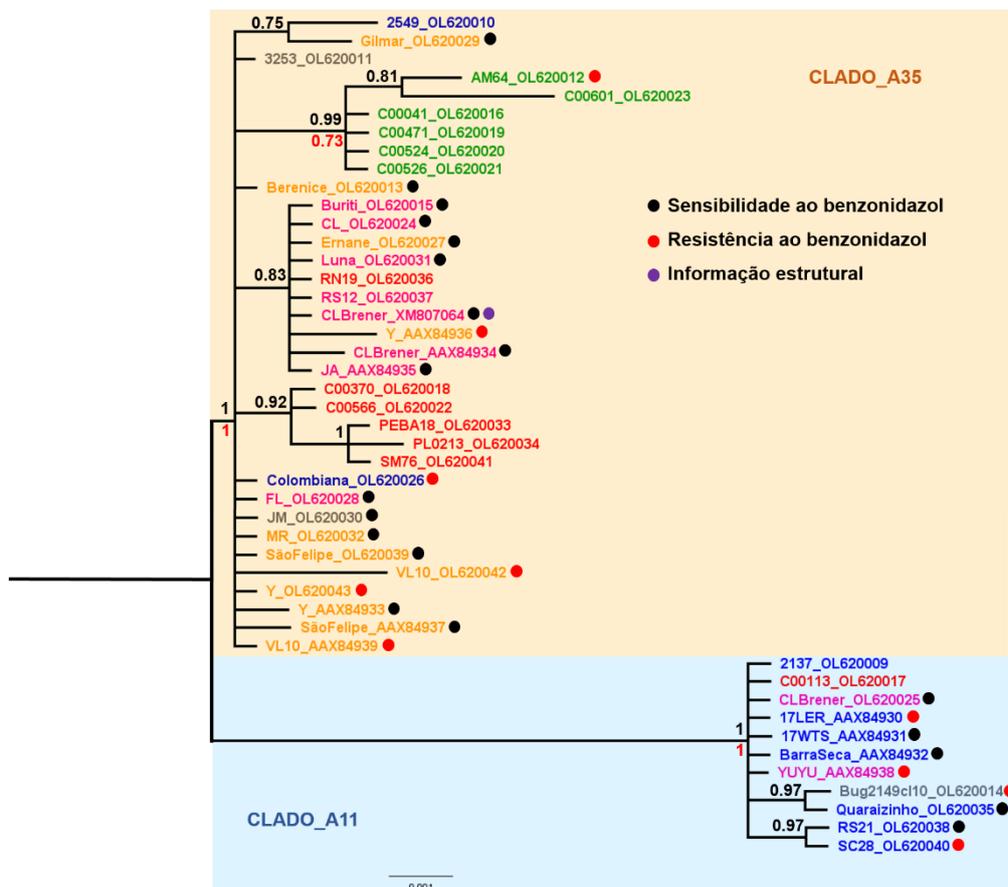
Outro aspecto verificado foi a arquitetura proteica das enzimas codificadas por cada gene sequenciado. Essa verificação é importante uma vez que genes que codificam domínios distintos ou em ordem alterada dificultam a reconstrução de árvores que hipotetizam relações filogenéticas bem resolvidas. Tanto as sequências de FeSOD-A quanto de FeSOD-B apresentaram os domínios PF00081 (N-terminal) e PF02777 (C-terminal) nesta ordem.

A utilização de dois métodos probabilísticos para as reconstruções filogenéticas, refletiram na mesma topologia observada. Essa informação se aplica tanto em termos de distribuição dos genes nos diferentes clados, como pelo fato de não ter sido observada diferença significativa no comprimento dos ramos.

As árvores que mostram as relações evolutivas entre os genes de FeSOD-A (Figura 6) e FeSOD-B (Figura 7) apresentaram dois clados principais nomeados de acordo com a letra que diferencia o tipo de FeSOD e quantidade de elementos do clado (A35, A11, B23 e B13).

Figura 6: Relações evolutivas das 46 FeSODs do tipo A de *T. cruzi* obtidas no presente trabalho e aquelas disponíveis em bancos de dados públicos.

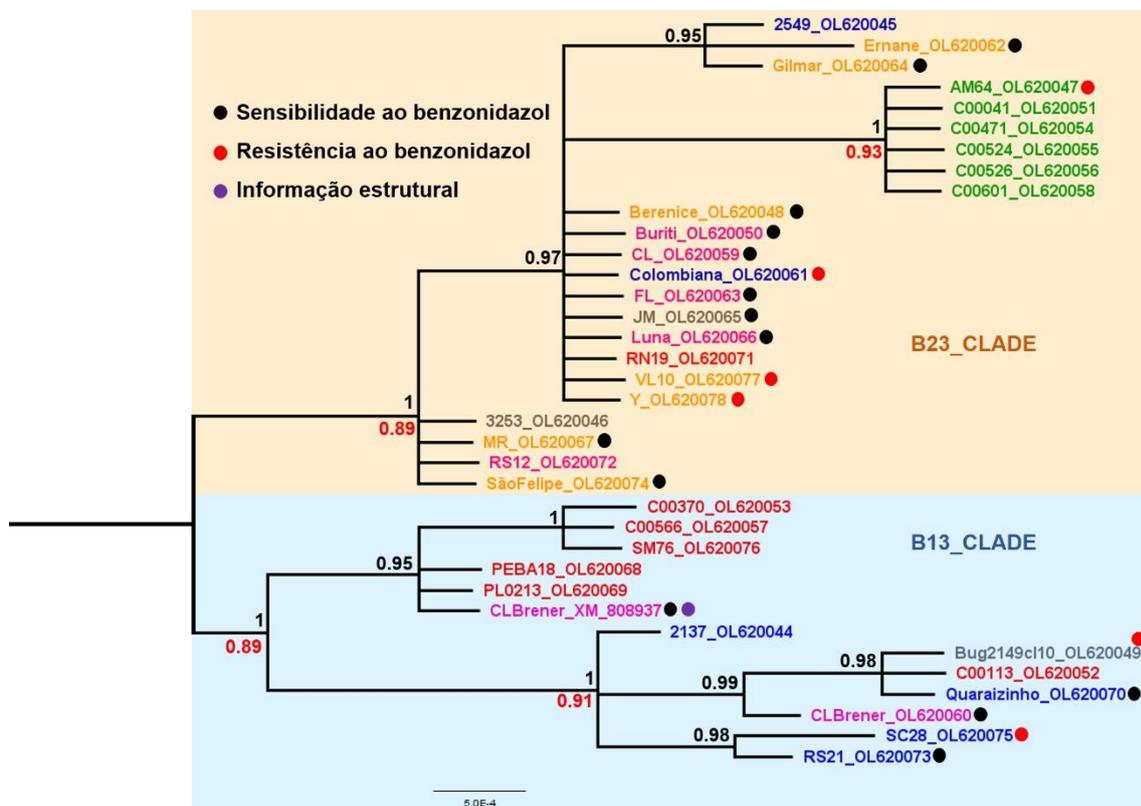
O nome das sequências nucleotídicas obtidas no presente estudo está representado pela cepa (Tabela 2) e identificador do GenBank. As sequências de bancos de dados públicos foram nomeadas de acordo com a cepa e identificador do ENA, com exceção de CL_Brener.XM_807064, recuperada do RefSeq (Tabela 4). O gene da cepa Tulahuen foi removido por ter gerado artefato. A distinção entre as *discrete typing units* foi elucidada por cores: TcI (azul), TcII (laranja), TcIII (vermelho), TcIV (verde), TcV (cinza) e TcVI (rosa). O alinhamento gerado possui um total de 573 sítios. Genes de cepas sensíveis ao benzonidazol estão indicados com círculos pretos e genes de cepas resistentes com círculos vermelhos. O círculo roxo indica o elemento da árvore que codifica uma proteína que contém informação em nível de estrutura. A filogenia foi reconstruída por dois métodos usando o best fit model (Kimura-2 parameter) e com a proporção de sítios invariáveis. Os valores de apoio referentes à Inferência Bayesiana são os de probabilidade posterior representados em preto (acima dos nós). Para máxima verossimilhança, os apoios estatísticos são os valores de *Bootstrap* em vermelho (abaixo dos nós). Foram mostrados apenas os valores de apoio acima de 70%.



Fonte: Hickson *et al.*, 2022.

Figura 7: Relações evolutivas das 36 FeSODs do tipo B de *T. cruzi* obtidas no presente trabalho e aquelas disponíveis em bancos de dados públicos.

O nome das sequências nucleotídicas obtidas no presente estudo está representado pela cepa (Tabela 2) e identificador do GenBank. A sequência de banco de dados públicos foi nomeada de acordo com a cepa e identificador do RefSeq (CL_Brener.XM_808937 - Tabela 4). O gene da cepa Tulahuen foi removido por ter gerado artefato. A distinção entre as *discrete typing units* foi elucidada por cores: TcI (azul), TcII (laranja), TcIII (vermelho), TcIV (verde), TcV (cinza) e TcVI (rosa). O alinhamento gerado possui um total de 484 sítios. Genes de cepas sensíveis ao benzonidazol estão indicados com círculos pretos e genes de cepas resistentes com círculos vermelhos. O círculo roxo indica o elemento da árvore que codifica uma proteína que contém informação em nível de estrutura. A filogenia foi reconstruída por dois métodos usando o best fit model (HKY85) e com a proporção de sítios invariáveis. Os valores de apoio referentes à Inferência Bayesiana são os de probabilidade posterior representados em preto (acima dos nós). Para máxima verossimilhança, os apoios estatísticos são os valores de *Bootstrap* em vermelho (abaixo dos nós). Foram mostrados apenas os valores de apoio acima de 70%.



Fonte: Hickson *et al.*, 2022.

A história evolutiva observada nos leva a crer que para cada tipo de FeSOD estudado, existam dois subtipos de FeSOD, que podem se tratar de diferentes variantes funcionais da enzima. A hipótese que melhor explica a origem dessas variantes é a duplicação gênica seguida de divergência. Em outras palavras, corresponde ao evento de duplicação gênica seguida de mudança na composição dos aminoácidos. Esse é o evento mais frequentemente envolvido no processo evolutivo das moléculas dos organismos e pode provocar alteração da função de uma das proteínas, formação de pseudogenes ou origem de proteínas com funções idênticas ou semelhantes. Outra possibilidade é que os dois genes sofram mutações deletérias, porém

diferentes funções são afetadas entre os genes. Nesse último caso eles se tornam complementares, mantendo a função original do gene ancestral. Genes derivados de eventos de duplicação que de alguma forma beneficiam o organismo, podem ser fixados no genoma por seleção natural.

O desvio padrão médio das frequências divididas (do inglês *average standard deviation of split frequencies* ou ASDSF) e fator de redução de escala potencial das reconstruções filogenéticas (do inglês *potential scale reduction factor* ou PSRF) da base de dados de FeSOD-A foram de 0.009862 e 1,001 respectivamente. Para FeSOD-B, o ASDSF foi de 0.009909 e o PSRF 0,01.

Não houveram padrões cladísticos de região geográfica de isolamento dos parasitos e de hospedeiro. O número de amostras pode não ser representativo o suficiente para observação desses tipos de padronagem.

As relações evolutivas dessa família multigênica mostra claramente que os membros das cepas de DTU do tipo IV formam um grupo monofilético. Isso pode ser observado tanto na árvore de FeSOD-A quanto na árvore de FeSOD-B.

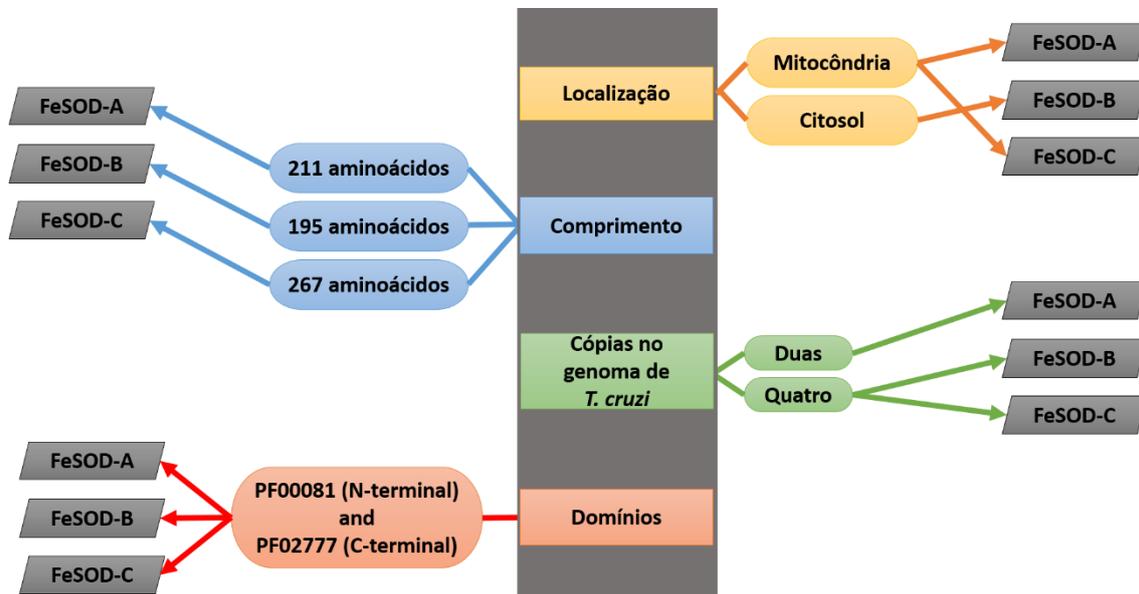
Os resultados mostram que as relações filogenéticas entre as FeSODs do tipo B estão mais bem resolvidas comparado com a história evolutiva dos genes tipo A. De modo geral, a utilização de dois métodos probabilísticos permitiu que a maioria das informações hipotetizadas nos clados pudessem ser discutidas em ambas as árvores.

A anotação das árvores foi feita com base nas evidências experimentais das sequências de bancos de dados públicos. Isso possibilita, de forma indireta, que os genes sequenciados possam ter suas características preditas com base nas sequências com evidência experimental prévia residentes de um mesmo clado ou grupo irmão.

Dados experimentais dos genes dessas duas árvores serão discutidos com detalhes na sessão de discussão e quando possível serão associados aos genes sem caracterização experimental.

A fim de representar os resultados obtidos e algumas caracterizações das enzimas de estudo disponíveis em bancos de dados públicos, nós construímos um diagrama com as diferenças entre as FeSOD-A, FeSOD-B e FeSOD-C. O diagrama informa sobre a localização celular, comprimento (em aminoácidos), número de cópias dos genes das FeSODs presentes no genoma do clone CL Brener e códigos (do banco de dados Pfam) das famílias de domínios proteicos de cada tipo de FeSOD (Figura 8).

Figura 8: Diagrama apresentando as diferenças entre os genes de FeSOD-A, FeSOD-B e FeSOD-C de *T. cruzi*.



Fonte: Hickson *et al.* (2022).

5.6 Pesquisa de compostos que interagem com as FeSODs

5.6.1 Seleção dos compostos

Utilizamos todas as sequências aminoacídicas codificadas pelos genes das bases de dados das reconstruções filogenéticas, para a busca de compostos que potencialmente interagem com essas proteínas, a fim de avaliar esses compostos quanto ao seu potencial quimioterápico. A pesquisa foi realizada com a ferramenta de busca de compostos do DrugBank, que funciona alinhando as sequências fornecidas com as sequências dos compostos armazenados no banco. Foram encontradas cinco opções. Diante dos resultados, selecionamos dois compostos (mangafodipir e polaprezinc) que podem apresentar algum tipo de ação contra as enzimas de *T. cruzi* presentes nas filogenias. As demais opções foram excluídas ou por se tratarem de ácidos, ou por não terem muitas informações descritas e nenhuma aplicação prévia em saúde.

Segundo os dados disponíveis no DrugBank e na literatura, os compostos escolhidos possuem aplicação em saúde, além de estarem disponíveis para compra.

5.6.2 Ensaios *in vitro*

Inicialmente ambos os compostos foram adicionados nos meios de cultura em concentração de 1000 μM . O polaprezinc também foi adicionado em concentrações micromolares de 500, 250, 125 e 62.5. No entanto, a maioria das concentrações testadas provocou a morte celular dos fibroblastos, apresentando apenas 14% atividade tripanocida em concentração de 62.5 μM . Esse composto foi inativo contra *T. cruzi*.

O mangafodipir provocou redução dos parasitos, porém teve efeito tripanocida (69%) na concentração mais alta (1000 μM), com IC_{50} de 839 μM . O índice de citotoxicidade para células L929 foi de 2.298 μM (CC_{50}). Assim, esse composto não foi aprovado para testagem *in vivo*, uma vez que apresentou índice de seletividade (IS) de 2.7, sendo pouco seletivo contra *T. cruzi*. Apenas compostos com IS maior que 50 são indicados para estudos de atividade contra *T. cruzi in vivo*. Desta forma, os compostos testados foram considerados inativos contra o parasito (Tabela 7).

Tabela 7: Atividade dos compostos contra os parasitos.

Composto	Concentração (M)	Atividade ¹ (%)	IC_{50} <i>T. cruzi</i> ² (μM)	CC_{50} L929 ³ (μM)	Índice de Seletividade (IS) ⁴
Polaprezinc	1.000 500 250 125 62,5	Morte celular Morte celular Morte celular Morte celular 14	Inativo	-	-
Mangafodipir	1.000 500	69 10	839	2,298	2,7
Benzonidazol	3,8	83	3,81 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	2,381 (625 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	625

¹ Redução (%) de amastigotas e tripomastigotas pelos compostos; ²Concentração dos compostos que inibe 50% do crescimento das formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*; ³Concentração dos compostos que inibe 50% da viabilidade das células L929; ⁴ CC_{50} L929/ IC_{50} *T. cruzi*. Os valores de IC_{50} e CC_{50} foram calculados por interpolação linear. A determinação do CC_{50} para o polaprezinc não foi possível devido à baixa solubilidade nas concentrações > 50 μM .

6 DISCUSSÃO

As FeSODs são responsáveis pela desintoxicação dos radicais superóxidos, convertendo-os em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Desta forma, elas compõem um conjunto de enzimas de grande importância na defesa antioxidante dos tripanosomatídeos. No presente estudo, fornecemos uma predição da biodiversidade molecular e as relações evolutivas de FeSODs em diferentes cepas de *T. cruzi*. Nossas buscas nos bancos de dados públicos UniProt e Pfam, sugerem que essas enzimas são membros de famílias de genes/proteínas nos parasitos.

O conhecimento de membros de famílias multigênicas fornece um melhor entendimento da evolução desses genes e seus produtos. Além disso, permite a predição funcional de genes não caracterizados, auxilia no desenvolvimento de estratégias terapêuticas e pode elucidar aspectos sobre o funcionamento da via em que esses genes operam. Genes e proteínas homólogas podem desempenhar funções semelhantes, idênticas, complementares ou substitutivas. É importante que os candidatos a drogas interajam com todos os membros de famílias multigênicas, a fim de garantir o efeito desejado.

Com relação ao número de cópias dos genes FeSODs no genoma CL Brener, nossos resultados mostraram duas cópias do gene FeSOD-A muito semelhantes em nível de sequência (99% de identidade), quatro cópias do gene FeSOD-B com dois pares semelhantes e quatro cópias de FeSOD-C. Nos genes FeSOD-B, a diferença mais marcante está na extremidade C-terminal, onde os *scaffolds* 24 e 110 (98% de identidade) possuem alguns nucleotídeos extras quando comparados aos *scaffolds* 74 e 188 (99% de identidade). Estes resultados estão de acordo com a análise de *Southern blot* anterior usando digestão por sítio de restrição PstI, que mostra a presença de duas FeSOD-A e quatro cópias do gene FeSOD-B no clone 2 de Tulahuen (ISMAIL *et al.*, 1997). Em nosso estudo, as sequências do genoma de CL Brener correspondentes aos genes FeSOD-A e FeSOD-B compartilham 69% de identidade. Nossos resultados também mostraram que existem quatro cópias do gene FeSOD-C no genoma CL Brener. As duas cópias do gene FeSOD-C presentes no *scaffold* 91, compartilham 99% de identidade e as outras duas cópias no *scaffold* 112 também são 99% idênticas. Em geral, as sequências dos dois *scaffolds* são altamente semelhantes.

Construímos um diagrama que mostra as diferenças entre as FeSOD-A, FeSOD-B e FeSOD-C. Para isso, escolhemos um exemplar bem caracterizado de cada uma delas. O diagrama inclui as informações obtidas no presente estudo sobre o número de cópias no genoma

de CL Brener. De modo geral, as informações sobre FeSODs, disponíveis nos bancos de dados públicos, são escassas. Dessa forma, nosso trabalho é um recurso para melhor entendimento sobre essas proteínas em *T. cruzi*.

Realizamos a inferência filogenética dos genes FeSOD-A e FeSOD-B de *T. cruzi*. A principal diferença entre esses dois tipos de proteína, está na extremidade 5', onde uma porção composta por 15 nucleotídeos está presente no FeSOD-A e ausente no FeSOD-B. Esta extensão de aminoácidos na região N-terminal, representa um padrão geral de um peptídeo sinal mitocondrial (ISMAIL *et al.*, 1997). As FeSOD-B de *T. cruzi* estão localizadas no citosol e no glicossomo (MATEO *et al.*, 2008; MARTÍNEZ *et al.*, 2014). Nosso conjunto de dados também revela alta similaridade entre as sequências dos genes FeSOD-A e FeSOD-B separadamente. Os resultados de inferência filogenética das FeSODs de *T. cruzi* estão representadas por árvores com dois clados principais que sugerem a existência de dois subtipos de cada enzima (FeSOD-A e FeSOD-B) (Figuras 6 e 7). Este perfil enzimático diversificado em localizações celulares distintas, garante uma ação mais eficaz contra oxidantes (VILLAGRÁN *et al.*, 2005; PIACENZA *et al.*, 2013; MARTÍNEZ *et al.*, 2014; MARTÍNEZ *et al.*, 2019). Dufernez *et al.* (2006) reconstruiu a história evolutiva entre sequências de aminoácidos de FeSODs de *Trypanosoma brucei* e outros organismos. Os resultados desse estudo mostram que as relações filogenéticas sugerem que FeSODs dos subtipos B1 e B2 emergiram independentemente de ancestrais específicos por duplicação gênica em cada espécie do conjunto de dados (*T. brucei*, *Trypanosoma congolense*, *T. cruzi*, *Trypanosoma vivax* e *Leishmania*). Nas espécies de *Leishmania*, os tipos B1 e B2 estão distribuídos em clados separados, enquanto nas espécies de *Trypanosoma*, essas proteínas são reunidas em um único clado. Embora tal topologia possa ser explicada como resultado de duplicações gênicas que ocorreram independentemente em cada espécie de *Trypanosoma*, tal cenário evolutivo é improvável. Dufernez *et al.* (2006) sugerem a existência de uma correlação entre FeSODs A e C e entre FeSODs do tipo B, propondo a ocorrência de mais de um evento de transferência gênica lateral que deu origem a múltiplas FeSODs em *T. brucei* (DUFERNEZ *et al.*, 2006). De acordo com nossos resultados, também propomos que as duas variantes funcionais de FeSOD-A e FeSOD-B detectadas foram originadas por eventos de duplicação seguidos de divergência.

Não observamos congruências por região geográfica e isolamento das cepas de *T. cruzi* nas árvores dos genes de FeSODs (Figuras 6 e 7). Por outro lado, observamos um clado bem apoiado estatisticamente, com um grupo monofilético composto por todos os genes FeSOD-A e FeSOD-B das cepas TcIV *T. cruzi* em cada filogenia.

Lewis *et al.* (2011) propuseram que a origem das cepas TcIV se deve a eventos de hibridização intraespecífica entre TcI e TcII, gerando os ecótipos ancestrais de TcIII e TcIV. As cepas dessa DTU TcIV possuem várias características particulares. Elas estão predominantemente presentes na região amazônica, infectando principalmente primatas não humanos. Elas exibem alta virulência em um curto período de pré-patente em camundongos infectados, produzindo amplo tropismo tecidual em direção ao músculo esquelético e altas taxas de parasitemia e mortalidade na fase aguda da infecção (MONTEIRO *et al.*, 2013). Hipotetizamos que a ancestralidade comum entre as FeSODs de *T. cruzi* possam eventualmente refletir as particularidades das cepas da DTU TcVI. Além disso, essas características são dependentes de múltiplos fatores bioquímicos e fisiológicos do parasito que influenciam na sua capacidade de sobrevivência e infectividade no organismo hospedeiro. Mais especificamente, propomos que o conjunto de mecanismos evolutivos que moldaram a evolução dos genes codificadores das FeSODs nas cepas TcIV são de caráter plesiomórfico à divergência do ancestral que originou as cepas desta DTU. Nesse contexto, nossos resultados corroboram estudos anteriores associados ao desenvolvimento de um esquema de tipagem de sequências multilocus (do inglês, *multilocus sequence typing* ou MLST) que foi aplicado para *T. cruzi* (Lauthier *et al.*, 2012). Nesta abordagem, os autores analisaram 10 genes *housekeeping*, incluindo os genes FeSOD-A e FeSOD-B. Essas sequências foram recuperadas de 32 cepas diferentes de *T. cruzi* pertencentes às seis DTUs. A abordagem utilizada foi a concatenação de combinações distintas de fragmentos gênicos de cepas de diferentes DTUs, a fim de reconstruir árvores com um grupo monofilético para cada tipo do parasito. Só foi possível obter o grupo monofilético das cepas TcIV, a partir de quatro *loci* que incluem fragmentos dos genes de FeSOD-B (LAUTHIER *et al.*, 2012). Assim, propomos que as diferenças genotípicas dos genes das FeSODs podem definir o sinal filogenético que classifica as DTUs do tipo IV.

Nossa base de dados inclui sequências que foram usadas em estudos que mostram papéis importantes da FeSOD na defesa antioxidante de *T. cruzi* contra formas tóxicas de oxigênio e nitrogênio do metabolismo de drogas e do sistema imunológico do hospedeiro.

As FeSODs do tipo B, protegem o *T. cruzi* contra a toxicidade pelo peroxinitrito dentro do fagossomo, impedindo sua formação ou reagindo diretamente com o oxidante (MARTÍNEZ *et al.*, 2019). Esses resultados evidenciam a participação das FeSODs no favorecimento da proliferação, sobrevivência e virulência de *T. cruzi* (PIACENZA *et al.*, 2007; ESTRADA *et al.*, 2018).

No presente estudo, não foi detectada correlação entre fenótipo de susceptibilidade à fármacos entre as cepas analisadas a partir dos cladogramas formados nas filogenias inferidas. Nas árvores de FeSOD-A e FeSOD-B (Figuras 6 e 7), cladogramas bem apoiados estatisticamente apresentam cepas mostrando diferentes susceptibilidades ao BZ. Estudos prévios de investigação da expressão e atividade enzimática específica desenvolvidos por nosso grupo, destacaram fortes indícios de que as FeSODs de tripanosomatídeos estão associadas ao mecanismo de resistência a fármacos (NOGUEIRA *et al.*, 2006; MURTA *et al.*, 2008; SANTI *et al.*, 2021).

Neste estudo, traduzimos as sequências gênicas utilizadas na reconstrução das árvores, para pesquisa de potenciais compostos que interagem com essas proteínas e que, portanto, apresentam potencial terapêutico contra o *T. cruzi*. Identificamos dois compostos, o polaprezinc e o mangafodipir. O polaprezinc é um quelato formado por zinco e L-carnosina com ação terapêutica para o tratamento de úlceras de pressão e outras lesões na mucosa intestinal (SAKAE & YANAGISAWA, 2014; THOMSEN & VITETTA, 2019; LIU *et al.*, 2019). Estudos apontam sua eficácia em quimioterapia oncológica (YE *et al.*, 2017; FUJII *et al.*, 2018), efeitos terapêuticos na função cardíaca pós infarto agudo do miocárdio (YOSHIKAWA *et al.*, 2019) e proteção contra doenças respiratórias (KIMURA *et al.*, 2019). O mangafodipir é um quelato de manganês responsável pela liberação de íons livres de manganês no sangue. É usado como agente de contraste em exames de diagnóstico por imagem que visam detectar lesões hepáticas e pancreáticas que podem ser derivadas de câncer (CHUNG *et al.*, 2006; ESER *et al.*, 2006; MOSBAH *et al.*, 2012). O composto já apresenta resultados promissores para o tratamento de doenças cardíacas e neuropatias (KARLSSON *et al.*, 2015; KARLSSON *et al.*, 2017; SANCHEZ-RAMOS *et al.*, 2018). A atividade *in vitro* de ambos os compostos contra as formas tripomastigota e amastigota de *T. cruzi* foi avaliada. O polaprezinc foi inativo contra *T. cruzi*. O mangafodipir exibiu baixa atividade tripanocida com IC₅₀ de 839 µM, sendo essa concentração 220 vezes maior que o IC₅₀ do BZ (3,1 µM). Ele também apresentou alta toxicidade em células L929 com CC₅₀ de 2.298 µM e baixo índice de seletividade (IS 2,7). Apesar dos compostos testados *in vitro* não terem sido promissores, observamos alta conservação observada entre as sequências gênicas das FeSODs de *T. cruzi*. Além disso, é importante considerar que os humanos não possuem FeSODs e sim SODs que possuem manganês (MnSOD) ou cobre e zinco (Cu-ZnSODs) como grupos prostéticos. Esses fatores sinalizam o alto potencial dessas proteínas como alvo de novos testes diagnósticos, vacinas e fármacos. Até o momento, os inibidores de FeSOD mais estudados foram os derivados da ftalazina, que geralmente são constituídos de anéis de imidazol. A maioria deles apresentou

capacidade de redução da parasitemia, baixa toxicidade e pouca atividade contra Cu-ZnSODs humanas (OLMO *et al.*, 2015a., OLMO *et al.*, 2015b).

7 CONCLUSÕES

Obtivemos com sucesso sequências de alta qualidade dos genes codificadores das FeSODs de *T. cruzi*. As sequências foram utilizadas para a realização de inferências filogenéticas que sugeriram a existência de duas variantes funcionais de cada tipo de FeSOD entre as cepas de *T. cruzi*. Formulamos a hipótese de que essas variantes vêm se diferenciando por meio de eventos de duplicação seguidos de divergência ao longo da evolução. Este é um resultado exclusivo e concernente com outros estudos que indicam a necessidade do parasito em ter um aparato diverso de enzimas responsáveis pela atividade protetiva contra oxidantes em diferentes circunstâncias e compartimentos celulares. As FeSODs de cepas da DTU TcIV fazem parte de um grupo monofilético, sugerindo que a história evolutiva das FeSODs reflete na evolução dessa DTU. Ao pesquisar candidatos a fármacos/compostos que interagem com as FeSODs, encontramos dois compostos (mangafodipir e polaprezinc) com potencial efeito tripanocida. No entanto, após serem testados *in vitro* contra os parasitos, ambos não apresentaram resultados promissores como alvos dos próximos estudos de novos fármacos para tratamento da doença de Chagas. Este estudo contribuiu para um melhor entendimento sobre a biodiversidade molecular das FeSODs de *T. cruzi*. Propomos uma abordagem satisfatória para a pesquisa de potenciais famílias gênicas alvo de novos compostos tripanocidas.

8 PERSPECTIVAS

Pretendemos seguir o plano de trabalho desenvolvido tendo como alvo a tripanotona sintetase (TryS) de *T. cruzi*. Recentemente, iniciamos as análises computacionais de investigação dessa enzima como membro de família multigênica. No momento estamos colhendo informações sobre a importância da TryS para o parasito, além de características de estrutura, função, expressão e potencial dela como alvo terapêutico contra o *T. cruzi*. Para isso, estamos revisando a literatura e utilizando bancos de dados públicos e ferramentas computacionais.

Pretendemos utilizar sequências de bancos de dados da TryS para reconstruir a história evolutiva dessas enzimas. Em paralelo, sequências aminoacídicas da TryS serão usadas como

padrão de busca de compostos que interagem com o alvo selecionado. Caso sejam encontrados compostos com potencial terapêutico, eles serão submetidos a testes *in vitro* contra formas promastigotas e amastigotas, como forma de avaliar seu efeito tripanocida. Iremos selecionar alguns dos derivados de ftalazina que apresentaram resultados promissores em testes de efeito tripanocida desenvolvidos em estudos anteriores. Esses compostos serão submetidos ao protocolo de testagem *in vitro* proposto no presente estudo como forma de dar continuidade a investigação de atividade contra o *T. cruzi*.

O trabalho proposto pode melhorar o entendimento da defesa antioxidante do parasito e permite a avaliação da enzima como alvo de novas abordagens terapêuticas e/ou estratégias de reposicionamento de fármacos contra a doença de Chagas.

9 REFERÊNCIAS

- AKAIKE, H. *et al.* A new look at the statistical model identification. **Tree transactions on automatic control**, v. 19, n. 6, 1974.
- AMID, C. *et al.* The European Nucleotide Archive. **Nucleic Acids Res**, v. 48, p. 70-76, 2020.
- ANISIMOVA, M., GASCUEL, O. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. **Syst Biol**, v. 55, n. 4, p. 539-52, 2006.
- ARNER, E. *et al.* Database of *Trypanosoma cruzi* repeated genes: 20,000 additional gene variants. **BMC Genomics**, v. 8, n. 39, 2007.
- ASLETT, M. *et al.* TryTripDB: a functional genomic resource for the trypanosomatidae. **Nucleic Acids Res**, v. 38, 2010.
- BACHEGA, J. F. R. *et al.* Systematic structural studies of iron superoxide dismutases from human parasites and a statistical coupling analysis of metal binding specificity. **Proteins**, v. 77, p. 26-37, 2009.
- BANNISTER, J. V., BANNISTER, W. H., ROTILIO, G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. **CRC Crit Rev Biochem**, v. 22, p. 2, 1987.
- BARRETT, T. V. *et al.* Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 74, p. 84-90, 1980.
- BARTON, N. H. *et al.* Evolution. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2007.
- BERNÁ, L. *et al.* Expanding an expanded genome: long-read sequencing of *Trypanosoma cruzi*. **Microb Genom**, v. 4, 2018.
- BEZERRA, C. M. *et al.* Fast recovery of house infestation with *Triatoma brasiliensis* after residual insecticide spraying in a semiarid region of Northeastern Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 14, n. 7, p. 1-17, 2020.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas: 14 de abril – Dia Mundial. Boletim Epidemiológico, 2021.
- BRENER, Z. *et al.* Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas' disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 205-212, 1987.
- BRISSE, S. *et al.* Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. **Infect, Genet Evol**, v. 2, n. 3, p. 173-83, 2003.
- BUCKNER, F. S. *et al.* Efficient Technique for Screening Drugs for Activity against *Trypanosoma cruzi* Using Parasites Expressing b-Galactosidase. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 40, n. 11, p. 2592-2597, 1996.
- CALLEJAS-HERNÁNDEZ, F. *et al.* Analysis of mRNA processing at whole transcriptome level, transcriptomic profile and genome sequence refinement of *Trypanosoma cruzi*. **Sci Rep**, v. 9, 2019.
- CAMANDAROBA, E. L., LIMA, C. M. P., ANDRADE, S. G. Oral transmission of Chagas disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biodeme in the intragastric experimental infection. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 44, p. 97-103, 2002.
- CANÇADO, J. R. *et al.* Criteria of Chagas Disease Cure. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 1, p. 331-335, 1999.

- CARRANZA, J. C. *et al.* *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil. **Int J Parasitol**, v. 39, p. 963-973, 2009.
- CASTRO, J. A., DE MECCA, M. M., BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Hum Exp Toxicol**, v. 25, p. 471-479, 2006.
- Centers for Disease Control and Prevention, 2019. American trypanosomiasis: Prevention & Control. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/prevent.html>. Acesso em: 03 out. 2022.
- CHAGAS, C. R. J. *et al.* Nova Trypanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.
- CHUNG, M. D. J, KIM, M. D. M, KIM, M. D. K. Mangafodipir Trisodium-Enhanced MRI for the Detection and Characterization of Focal Hepatic Lesions: Is Delayed Imaging Useful? **J Magn Reson Imaging**, v. 23, p. 706-711, 2006.
- COURA, J. R., DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 31-40, 2009.
- CUESTA-ASTROZ, Y. *et al.* Evolutionary analysis of the cystatin Family in three *Schistosoma* species. **Front Genet**, v. 5, n. 206, 2014.
- CURA, C. I. *et al.* *Trypanosoma cruzi* I genotypes in different geographical regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced-leader genes. **Int J Parasitol**, v. 40, p. 1599-1607, 2010.
- CURA, C. I. *et al.* *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in Chagas disease patients from endemic and non-endemic regions of Argentina. **Parasitology**, v. 139, p. 516-521, 2012.
- DARRIBA, D. *et al.* jModelTest 2: more models, new heuristics and high-performance computing. **Nat Methods**, v. 9, n. 8, p. 772, 2012.
- DIAS, J. C. P. *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 25, p. 7-86, 2016.
- DOCAMPO, R. *et al.* Mechanism of Nifurtimox Toxicity in Different forms of *Trypanosoma cruzi*. **Biochem Pharmacol**, v. 30, n. 14, p. 1947-1951, 1981.
- DUFERNEZ, F. *et al.* The presence of four iron-containing superoxide dismutase isozymes in *Trypanosomatidae*: Characterization, subcellular localization, and phylogenetic origin in *Trypanosoma brucei*. **Free Radic Biol Med**, v. 40, p. 210-225, 2006.
- DURBIN, R. *et al.* Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids. **Cambridge University Press**, 1999.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC Bioinformatics**, v. 5, n. 113, 2004.
- EL-SAYED, N. M. *et al.* The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. **Science** 309, 2005.
- ESER, G. *et al.* Mangafodipir trisodium-enhanced magnetic resonance imaging for evaluation of pancreatic mass and mass-like lesions. **World J Gastroenterol**, v. 12, n. 10, p. 1603-1606, 2006.
- ESTRADA, D. *et al.* Cardiomyocyte diffusible redox mediators control *Trypanosoma cruzi* infection: role of parasite mitochondrial iron superoxide dismutase. **Biochem J**, v. 475, p. 1235-1251, 2018.

- EWING, B. *et al.* Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Res**, v. 8, n. 3, p. 175-85, 1998.
- FALLA, A. *et al.* Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. **Acta Trop**, v. 110, p. 15-21, 2009.
- FERRER-SUETA, G., RADI, R. Chemical Biology of Peroxynitrite: Kinetics, Diffusion, and Radicals. **ACS Chem Biol**, v. 4, n. 3, p. 161–177, 2009.
- FILARDI, L. S., BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 81, p. 755-759, 1987.
- FINN, R. D. *et al.* The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Res**, v. 36, p. 281-8, 2008.
- FITCH, W. M. *et al.* Distinguishing homologous from analogous proteins. **Syst Zool**, v. 19, n. 2, p. 99-113, 1970.
- FREITAS, J. M. *et al.* Ancestral Genomes, Sex, and the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathog**, v. 2, n. 3, p. 24, 2006.
- FUJII, H. *et al.* Improvement of Dysgeusia by Polaprezinc, a Zinc-L-carnosine, in Outpatients Receiving Cancer Chemotherapy. **Anticancer Res**, v. 38, p. 6367-6373, 2018.
- GABALDÓN, T. *et al.* Evolution of proteins and proteomes: a phylogenetics approach. **Evol Bioinform Online**, v. 1, p. 51-61, 2007.
- GARZON, E. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* isoenzyme variability in Ecuador: first observation of zymodeme III genotypes in chronic chagasic patients. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 96, p. 378-382, 2002.
- GAUDENZI, J. G. *et al.* Gene expression regulation in trypanosomatids. **Essays Biochem**, v. 5, 2011.
- GHOSH, S., GOSWAMI, S., ADHYA, S. Role of superoxide dismutase in survival of *Leishmania* within the macrophage. **Biochem J**, v. 369, p. 447-452, 2003.
- GLEZ-PEÑA, D. *et al.* ALTER: program-oriented conversion of DNA and protein alignments. **Nucleic Acids Res**, v. 38, 2010.
- GOODSELL, D. S. *et al.* RCSB Protein Data Bank: Enabling biomedical research and drug discovery. **Protein Sci**, v. 29, p. 52-65, 2020.
- GUINDON, S., GASCUEL, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Syst Biol**, v. 52, n. 5, p. 696-704, 2003.
- GUINDON, S. *et al.* New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. **Syst Biol**, v. 59, n. 3, p. 307-321, 2010.
- GURGEL-GONÇALVES, R. *et al.* Geographic Distribution of Chagas Disease Vectors in Brazil Based on Ecological Niche Modeling. **J Trop Med**, 2012.
- HALL, S., WILKINSON, S. R. Activation of benzimidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 1, p. 115–123, 2012.
- HAMILTON, P. B. *et al.* Identification and lineage genotyping of South American trypanosomes using fluorescent fragment length barcoding. **Infect Genet Evol**, v. 11, p. 44-51, 2011.

- HASEGAWA, M., KISHINO, H., YANO, T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. **J Mol Evol**, v. 22, p. 160–174, 1985.
- HERNÁNDEZ, C. *et al.* Molecular Diagnosis of Chagas Disease in Colombia: Parasitic Loads and Discrete Typing Units in Patients from Acute and Chronic Phases. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, 2016.
- HUELSENBECK, J. O., LARGET, B., ALFARO, M. E. Bayesian Phylogenetic Model Selection Using Reversible Jump Markov Chain Monte Carlo. **Mol Biol Evol**, v. 21, n. 6, p. 1123-1133, 2004.
- ISMAIL, S. O. *et al.* Molecular cloning and characterization of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 86, p. 187-197, 1997.
- JACKSON, S. M. J., COOPER, J. B. An analysis of structural similarity in the iron and manganese superoxide dismutases based on known structures and sequences. **BioMetals**, v. 11, p. 159-173, 1998.
- KARLSSON, J. *et al.* Mangafodipir as a cardioprotective adjunct to reperfusion therapy: a feasibility study in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. **Eur Heart J Cardiovasc Trial**, v. 1, p. 39-45, 2015.
- KARLSSON, J. O. G., ANDERSSON, R. G. G., JYNGE, P. Mangafodipir a Selective Cytoprotectant - with Special Reference to Oxaliplatin and Its Association to Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy (CIPN). **Trans Oncol**, v. 10, n. 4, p. 641-649, 2017.
- KIM, S. M., KANG, J. H. Peroxidative Activity of Human Cu,Zn-Superoxide Dismutase. **Mol Cells**, v. 7, n. 1, p. 120-124, 1997.
- KIMURA, K. *et al.* Protective effect of polaprezinc on cadmium-induced injury of lung epithelium. **Metalomics**, v. 11, p. 1310-1320, 2019.
- KIRBY, T. W., LANCASTER JÚNIOR, J. R., FRIDOVICH, I. Isolation and characterization of the iron-containing superoxide dismutase of *Methanobacterium bryantii*. **Arch Biochem Biophys**, v. 210, n. 1, p. 140-148, 1981.
- KUMAR, S. *et al.* MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Mol Biol Evol**, v. 35, n. 6, p. 1547-1549, 2018.
- LAUTHIER, J. J. *et al.* Candidate targets for Multilocus Sequence Typing of *Trypanosoma cruzi*: Validation using parasite stocks from the Chaco Region and a set of reference strains. **Infect, Genet Evol**, v. 12, p. 350-358, 2012.
- LEROUX, A. E., KRAUTH-SIEGEL, R. L. Thiol redox biology of trypanosomatids and potential targets for chemotherap. **Mol Biochem Parasitol**, 206, p. 67-74, 2016.
- LEWIS, M. D. *et al.* Recent, Independent and Anthropogenic Origins of *Trypanosoma cruzi* Hybrids. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 10, 2011.
- LIU, L. *et al.* A brief utilization report on the Illumina HiSeq 2000 sequencer. **Mycology**, v. 2, n. 3, p. 169-191, 2011.
- LIU, Z. *et al.* Intrarectally administered polaprezinc attenuates the development of dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis in mice. **Exp Ther Med**, v. 18, p. 4927-4934, 2019.
- LUQUETTI, A. O. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 80, p. 462-470, 1986.
- MACHADO, M. *et al.* Phred-Phrap package to analyses tools: a pipeline to facilitate population genetics re-sequencing studies. **Investig Genet**, v. 2, 2011.

- MARTÍNEZ, A. *et al.* Structural and Molecular Basis of the Peroxynitrite-mediated Nitration and Inactivation of *Trypanosoma cruzi* Iron-Superoxide Dismutases (Fe-SODs) A and B. **J Biol Chem**, v. 289, n. 18, p. 12760-12778, 2014.
- MARTÍNEZ, A. *et al.* Cytosolic Fe-superoxide dismutase safeguards *Trypanosoma cruzi* from macrophage-derived superoxide radical. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 116, n. 18, p. 8879-8888, 2019.
- MATEO, H. *et al.* Purification and biochemical characterization of four iron superoxide dismutases in *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 3, p. 271-276, 2008.
- MATIOLI, S. R., FERNANDES, F. M. C. *Biologia Molecular e Evolução*, 2012. Holos, Sociedade Brasileira de Genética, 2012. 2 ed. Ribeirão Preto.
- MAYA, J. D. *et al.* Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 86, p. 101-106, 1997.
- MCCORD, J. M., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: An Enzymic Function for Erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **J Biol Chem**, v. 244, n. 22, p. 6049-6065, 1969.
- MILES, M. A. *et al.* The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. **Parasitology**, v. 136, p. 1509-1528, 2009.
- MILLÁS, J. *et al.* Breaking the silence: An Opportunity for patients with Chagas disease, 2016. Chagas Coliation.
- MITCHELL, J. B. *et al.* Enzyme function and its evolution. **Curr Opin Struct Biol**, v. 47, p. 151-156, 2017.
- MOLINA, I. *et al.* Toxic Profile of Benznidazole in Patients with Chronic Chagas Disease: Risk Factors and Comparison of the Product from Two Different Manufacturers. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 10, 2015.
- MONTEIRO, W. M. *et al.* *Trypanosoma cruzi* TcIII/Z3 genotype as agent of an outbreak of Chagas disease in the Brazilian Western Amazonia. **Tro Med Int Health**, v. 15, p. 1049-1051, 2010.
- MONTEIRO, W. M. *et al.* *Trypanosoma cruzi* I and IV Stocks from Brazilian Amazon Are Divergent in Terms of Biological and Medical Properties in Mice. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 2, 2013.
- MOSBAH, I. B. *et al.* Pretreatment with Mangafodipir Improves Liver Graft Tolerance to Ischemia/Reperfusion Injury in Rat. **PLoS One**, v. 7, n. 11, 2012.
- MUNCH, K. *et al.* Fast phylogenetic DNA barcoding. **Philos Trans R Lond B Biol Sci**, v. 363, p. 3997-4002, 2008.
- MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M. A., FERNÁNDEZ, M. A., FRESNO, M. Synergism between tumor necrosis factor- α and interferon- γ on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. **Eur J Immunol**, v. 22, p. 301-307, 1992.
- MURTA, S. M. F. *et al.* Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. **Mol Biochem Parasitol**, v. 93, p. 203-14, 1998.
- MURTA, S. M. F. *et al.* Differential gene expression in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. **Acta Trop**, v. 107, p. 59-65, 2008.

- NAHUM L. A., PEREIRA, S. L. Phylogenomics, Protein Family Evolution, and the Tree of Life: An Integrated Approach between Molecular Evolution and Computational Intelligence. *Studies in Computational Intelligence (SCI)*, v. 122, p. 259-279, 2008.
- NAHUM, L. A., GOSWAMI, S., SERRES, M. H. Protein families reflect the metabolic diversity of organisms and provide support for functional prediction. **Physicol Genomics**, v. 38, p. 250-260, 2009.
- NOGUEIRA, F. 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 Trop**, v.100, p. 119-32, 2006.
- OHNO, S. *et al.* Evolution by gene duplication, 1970. **Springer**.
- O'LEARY, N. A. *et al.* Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. **Nucleic Acids Res**, v. 44, p. 733-745, 2016.
- OLMO, F. *et al.* An in vitro iron superoxide dismutase inhibitor decreases the parasitemia levels of *Trypanosoma cruzi* in BALB/c mouse model during acute phase. **Int J Parasitol Drugs Drug Resist**, v. 5, n. 3, p.110-116, 2015a.
- OLMO, F. *et al.* Synthesis and Evaluation of In Vitro and In Vivo Trypanocidal Properties of a New Imidazole-Containing Nitrothalazine Derivative. **Eur J Med Chem**, v. 106, p. 106-119, 2015b.
- PAGE, R. D. M., HOLMES, E. C. Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach, 1998. **Wiley-Blackwell**.
- PARAMCHUK, W. J. *et al.* Cloning, characterization and overexpression of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Leishmania chagasi*: role in pathogenesis. **Mol Biochem Parasitol**, v. 90, p. 203-221, 1997.
- PHAN, I. Q. H. *et al.* Iron superoxide dismutases in eukaryotic pathogens: new insights from Apicomplexa and *Trypanosoma* structures. **Acta Crystallogr F Struct Biol Commun**, v. 71, p. 615-621, 2015.
- PIACENZA, L. *et al.* Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. **Biochem J**, v. 403, p. 323-334, 2007.
- PIACENZA, L. *et al.* *Trypanosoma cruzi* Antioxidant Enzymes As Virulence Factors in Chagas Disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 19, n. 7, 2013.
- PLEWES, K. A., BARR, S. D., GEDAMU, L. Iron Superoxide Dismutases Targeted to the Glycosomes of *Leishmania chagasi* Are Important for Survival. **Infect Immun**, v. 71, n. 10, p. 5910-5920, 2003.
- PUERTO, R. *et al.* Lineage analysis of circulating *Trypanosoma cruzi* parasites and their association with clinical forms of Chagas disease in Bolivia. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, 2010.
- RASSI, A., RASSI, A., REZENDE, J. M. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infect Dis Clin North Am**, v. 26, p. 275-291, 2012.
- RIDLEY, M. *et al.* Evolution, 2003. **Oxford University Press** ed. 3.
- ROMANHA, A. J. *et al.* *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 233-238, 2010.
- RONQUIST, F. *et al.* MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space, **Syst Biol** v. 61, n. 3, p. 539-542, 2012.

- SAKAE, K., YANAGISAWA, H. Oral Treatment of Pressure Ulcers with Polaprezinc (Zinc L-carnosine Complex): 8-Week Open-Label Trial. **Biol Trace Elem Res**, v. 158, p. 280-288, 2014.
- SALES JUNIOR, P. A. *et al.* Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. **Am J Trop Med Hyg**, v. 97, n. 5, p. 1289-1303, 2017.
- SAMBROOK J., RUSSELL D. W. Purification of nucleic acids by extraction with phenol: chloroform. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 1, 2006.
- SANCHEZ-RAMOS, J. *et al.* Chitosan-Mangafodipir nanoparticles designed for intranasal delivery of siRNA and DNA to brain. **J Drug Deliv Sci Technol**, v. 43, p. 453-460, 2018.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.
- SANTI, A. M. M., MURTA, S. M. F. Antioxidant defence system as a rational target for Chagas disease and Leishmaniasis chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 117, 2022.
- SANTI, A. M. M. *et al.* Downregulation of FeSOD-A expression in *Leishmania infantum* alters trivalent antimony and miltefosine susceptibility. **Parasit Vectors**, v. 14, n. 1, p. 366, 2021.
- SANZ, A. M. *et al.* Efficient Inhibition of Iron Superoxide Dismutase and of *Trypanosoma cruzi* Growth by Benzo[g]phthalazine Derivatives Functionalized with One or Two Imidazole Rings. **J Med Chem**, v. 51, n. 6, p. 1962-1966, 2008.
- SCHOLTE, L. L. S. *et al.* Evolutionary relationships among protein lysine deacetylases of parasites causing neglected diseases. **Infect Genet Evol**, v. 53, p. 175-188, 2017.
- SCHMUNIS, G. A. *et al.* The globalization of Chagas disease. **ISBT Science Series**, 2007.
- SQUASSERO, Y. *et al.* Course of Chronic *Trypanosoma cruzi* Infection after Treatment Based on Parasitological and Serological Tests: A Systematic Review of Follow-Up Studies. **PLoS One**, v. 10, n. 10, 2015.
- SHEREEN, M. A. *et al.* COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. **J Adv Res**, v. 24, p. 91-98, 2020.
- SOEIRO, M. N. C. *et al.* Experimental chemotherapy for Chagas disease: 15 years of research contributions from *in vivo* and *in vitro* studies. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 301-310, 2009.
- SOMARELLI, J. A. *et al.* PhyloOncology: Understanding cancer through phylogenetic analysis. **Biochim Biophys Acta Rev Cancer**, v. 1867, p. 101-108, 2017.
- TAPPEL, A. L. *et al.* Lipid peroxidation damage to cell components. **Fed Proc**, v. 32, n. 8, p. 1870- 4, 1973.
- TEMPERTON, N. J., WILKINSON, S. R., KELLY, J. M. Cloning of an Fe-superoxide dismutase gene homologue from *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 76, n. 1996, p. 339-343, 1996.
- TESSAROLLO, N. G. *et al.* Functional analysis of iron superoxide dismutase-A in wild-type and antimony-resistant *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* lines. **Parasitol Int**, v. 64, n. 2, p. 125-129, 2015.
- TESTON, A. P. M. *et al.* *In vivo* susceptibility to benznidazole of *Trypanosoma cruzi* strains from the western Brazilian Amazon. **Trop Med Int Health**, v. 18, n. 1, p. 85-95, 2013.
- The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase. **Nucleic Acids Res**, v. 45, 2017.

- THOMSEN, M., VITETTA, L. Zinc deficits, mucositis, and mucosal macrophage perturbation: is there a relationship? **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 22, n. 5, p. 365-370, 2019.
- TOLEDO, M. J. O. *et al.* Chemotherapy with Benznidazole and Itraconazole for Mice Infected with Different *Trypanosoma cruzi* Clonal Genotypes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 1, p. 223-230, 2003.
- TROCHINE, A. *et al.* Benznidazole biotransformation and multiple targets in *Trypanosoma cruzi* revealed by metabolomics. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 5, 2014.
- TURRENS, J. F. *et al.* Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. **Mol Aspects Med**, v. 25, p. 211-220, 2004.
- VALDIVIA, H. O. *et al.* The *Leishmania* metaphylome: a comprehensive survey of *Leishmania* protein phylogenetic relationships. **BMC Genomics**, v. 16, n. 887, 2015.
- VILLAGRÁN, M. E. *et al.* Use of an iron superoxide dismutase excreted by *Trypanosoma cruzi* in the diagnosis of chagas disease: seroprevalence in rural zones of the state of Queretaro, Mexico. **The Am J Trop Med Hyg**, v. 73, n. 3, p. 510-516, 2005.
- WEATHERLY, D. B., BOEHLKE, C., TARLETON, R. L. Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. **BMC Genomics**, v. 10, n. 255, 2009.
- WEI, Z., ZHANG, S. NPBS: a new PacBio sequencing simulator for generating the continuous long reads with an empirical model. **BMC Bioinformatics**, v. 19, n. 177, 2018.
- WILKINSON, S. R., KELLY, J. M. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. **Expert Rev Mol Med**, v. 11, 2009.
- WILKINSON, S. R. *et al.* Functional characterisation of the iron superoxide dismutase gene repertoire in *Trypanosoma brucei*. **Free Radic Biol Med**, v. 40, p. 198-209, 2006.
- WISHART, D. S. *et al.* DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. **Nucleic Acids Res**, v. 46, p. 1074-1082, 2018.
- WHO (World Health Organization). Health Topics. Chagas disease. Disponível em: http://www.who.int/topics/chagas_disease/en/. Acesso em: 27 Jul. 2020.
- YE, J. *et al.* Polaprezinc inhibits liver fibrosis and proliferation in hepatocellular carcinoma. **Mol Med Rep**, v. 16, p. 5523-5528, 2017.
- YOSHIKAWA, F. *et al.* Beneficial effect of polaprezinc on cardiac function post-myocardial infarction A prospective and randomized clinical trial. **Medicine (Baltimore)**, v. 98, n. 10, 2019.
- ZHANG, N. *et al.* Characterization of the 59 Flanking Region of the Human MnSOD Gene. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 220, n. 0376, p. 171-180, 1996.
- ZINGALES, B. *et al.* *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Acta Trop**, v. 184, p. 38-52, 2017.
- ZINGALES, B. *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051-4, 2009.
- ZINGALES, B. *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infect Genet Evol**, v. 12, n. 2, p. 240-53, 2012.
- ZINGALES, B. *et al.* *Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. **Acta Trop**, v. 68, n. 2, p. 159-73, 1997.

10 APÊNDICES

Apêndice 1 – Artigo referente aos resultados obtidos nesta tese.

Hickson J, Athayde LFA, Miranda TG, Junior PAS, Dos Santos AC, da Cunha Galvão LM, da Câmara ACJ, Bartholomeu DC, de Souza RCM, Murta SMF, Nahum LA. *Trypanosoma cruzi* iron superoxide dismutases: insights from phylogenetics to chemotherapeutic target assessment. *Parasits & Vectors*. 2022 Jun 6;15(1):194. doi: 10.1186/s13071-022-05319-2. PMID: 35668508.

Apêndice 2 – Artigo em colaboração desenvolvido durante o doutorado.

Horácio ECA, Hickson J, Murta SMF, Ruiz JC, Nahum LA. Perspectives From Systems Biology to Improve Knowledge of *Leishmania* Drug Resistance. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Apr 30;11:653670. doi: 10.3389/fcimb.2021.653670. PMID: 33996631.

RESEARCH

Open Access



Trypanosoma cruzi iron superoxide dismutases: insights from phylogenetics to chemotherapeutic target assessment

Jéssica Hickson¹, Lucas Felipe Almeida Athayde^{1,2}, Thainá Godinho Miranda^{1,2}, Policarpo Ademar Sales Junior¹, Anderson Coqueiro dos Santos², Lúcia Maria da Cunha Galvão^{2,3}, Antônia Cláudia Jácome da Câmara³, Daniella Castanheira Bartholomeu², Rita de Cássia Moreira de Souza¹, Silvane Maria Fonseca Murta^{1*†} and Laila Alves Nahum^{1,2,4*†}

Abstract

Background: Components of the antioxidant defense system in *Trypanosoma cruzi* are potential targets for new drug development. Superoxide dismutases (SODs) constitute key components of antioxidant defense systems, removing excess superoxide anions by converting them into oxygen and hydrogen peroxide. The main goal of the present study was to investigate the genes coding for iron superoxide dismutase (FeSOD) in *T. cruzi* strains from an evolutionary perspective.

Methods: In this study, molecular biology methods and phylogenetic studies were combined with drug assays. The FeSOD-A and FeSOD-B genes of 35 *T. cruzi* strains, belonging to six discrete typing units (TcI–TcVI), from different hosts and geographical regions were amplified by PCR and sequenced using the Sanger method. Evolutionary trees were reconstructed based on Bayesian inference and maximum likelihood methods. Drugs that potentially interacted with *T. cruzi* FeSODs were identified and tested against the parasites.

Results: Our results suggest that *T. cruzi* FeSOD types are members of distinct families. Gene copies of FeSOD-A ($n = 2$), FeSOD-B ($n = 4$) and FeSOD-C ($n = 4$) were identified in the genome of the *T. cruzi* reference clone CL Brener. Phylogenetic inference supported the presence of two functional variants of each FeSOD type across the *T. cruzi* strains. Phylogenetic trees revealed a monophyletic group of FeSOD genes of *T. cruzi* TcIV strains in both distinct genes. Altogether, our results support the hypothesis that gene duplication followed by divergence shaped the evolution of *T. cruzi* FeSODs. Two drugs, mangafodipir and polaprezinc, that potentially interact with *T. cruzi* FeSODs were identified and tested in vitro against amastigotes and trypomastigotes: mangafodipir had a low trypanocidal effect and polaprezinc was inactive.

Conclusions: Our study contributes to a better understanding of the molecular biodiversity of *T. cruzi* FeSODs. Herein we provide a successful approach to the study of gene/protein families as potential drug targets.

[†]Silvane Maria Fonseca Murta and Laila Alves Nahum are senior authors who contributed equally to this work

*Correspondence: silvane.murta@fiocruz.br; laila.nahum@fiocruz.br

[†] René Rachou Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Functional genomics of parasites group; Biosystems informatics, bioengineering and genomic group), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Iron superoxide dismutase, Antioxidant defense, Phylogenetic inference, Molecular evolution, Drug target

Background

The protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) is the causative agent of Chagas disease. This zoonosis occurs mainly in Latin America, but it is estimated that more than six million individuals are infected worldwide [1]. The under-reporting of infection and death rates represents an unprecedented challenge. Based on genetic diversity, *T. cruzi* is currently classified into six discrete typing units (DTUs: TcI–TcVI) [2, 3]. A seventh DTU, named TcBat, is a specific genotype that infects bats [4]. Different *T. cruzi* strains and clones display extensive morphological, biological, immunological, biochemical and pharmacological differences, which directly interfere in the clinical state of individuals with Chagas disease.

The current therapy for Chagas disease is limited to the drugs benznidazole (BZ) and nifurtimox (NFX) [5], which are very toxic, and the efficacy of treatment remains low in the chronic phase of the disease. Other factors influencing the treatment efficacy of these drugs in terms of cure include the treatment duration, drug dose, age of patient, geographical origin and individual patient's immune system. In addition, the occurrence of naturally resistant *T. cruzi* strains may be one of the most important variables in the failure to cure infected populations [5–8].

Trypanosomatids are subjected to intense oxidative stress caused by exposure to toxic subproducts, such as nitric oxide (NO), peroxynitrite ($\text{ONOO}^-/\text{ONOOH}$), superoxide anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroperoxides (containing hydroperoxide functional group ROOH), that are derived from cellular metabolism and from external agents (e.g. drug metabolites) and host immune mediators. However, trypanosomatids have an important and unique mechanism for the trypanothione-dependent detoxification of peroxides that differs from the mechanism found in vertebrates and, as such, is indicated as a rational target for chemotherapy [9]. Many enzymes involved in antioxidant defense are distributed in diverse cellular compartments, which are activated against various oxidants. Antioxidant contents of *T. cruzi* are a determinant of the parasite survival or death at the moment of the infection [10].

Superoxide dismutases (SODs) constitute an essential defense element against oxidative damage in various organisms [11–13]. These metalloproteases (EC 1.15.1.1) remove excess $\text{O}_2^{\bullet-}$ by converting them into

O_2 and H_2O_2 [14]. They are classified according to their prosthetic group (copper and zinc, iron or manganese, or nickel) and are found in different cellular localizations. Eukaryotes usually have copper-zinc (Cu/ZnSODs) and manganese (MnSODs) enzymes [15]. Iron SODs (FeSODs) are found in prokaryotes, protozoans, plants and algae [16]. As FeSOD is absent in the human host, this enzyme could be considered a potential target for chemotherapy against trypanosomatids [17, 18]. Some studies of *T. cruzi* FeSODs used sequence and structural data to characterize them biochemically [19, 20], while others focused on gene expression, drug association [21–23], functional studies [24, 25], infectivity and virulence [26, 27] and phylogenetic approaches [16, 28]. Taken together, these studies highlight the presence of distinct FeSODs acting in different cellular compartments (cytosol, glycosome and mitochondria). The vital roles of FeSODs also make them potential targets for new treatment or medicine, repositioning strategies against Chagas disease [17].

Phylogenetics may be applied to study the evolutionary history of gene and protein families and to access their molecular biodiversity [29–35]. This approach also provides a framework for functional prediction of molecular targets of interest [16, 29, 33]. The identification of gene/protein family members may reveal structural and/or functional variants, which is an essential aspect towards inferring the evolutionary history of potential drug targets.

In the present study, we investigated the molecular biodiversity and evolutionary relationships of FeSOD-A and FeSOD-B among different *T. cruzi* strains. We also evaluated the trypanocidal effect of two drugs (mangafodipir and polaprezinc) that potentially interact with *T. cruzi* FeSODs.

Methods

Trypanosoma cruzi strains

Thirty-five *T. cruzi* strains isolated from human patients, domestic vectors and sylvatic reservoirs or vectors, from different geographic areas, were used in this study (see Table 1; Additional file 1: Figure S1). Samples were obtained from the *T. cruzi* cryobanks at the René Rachou Institute-FIOCRUZ (Professor Zigman Brener Collection), Federal University of Minas Gerais-UFMG (Professor Egler Chiari Collection) and the Oswaldo Cruz Institute-FIOCRUZ (Collection of *Trypanosoma* from Wild and Domestic Mammals and Vectors-COLTRYP).

Table 1 Description of the *Trypanosoma cruzi* strains used in this study

Discrete typing unit	Strain	Origin	Host	Sus ^a	Reference for Sus
TcI	2137	Rio Grande do Norte	<i>Homo sapiens</i>	ND	–
	2549	Rio Grande do Norte	<i>Homo sapiens</i>	ND	–
	Colombiana	Colombia ^b	<i>Homo sapiens</i>	R	[37]
	Quaraizinho	Rio Grande do Sul	<i>Triatoma infestans</i>	S	[37]
	RS–21	Rio Grande do Sul	<i>Panstrongylus megistus</i>	S	[39]
	SC28	Santa Catarina	<i>Didelphis marsupialis</i>	R	[37]
TcII	Berenice	Minas Gerais	<i>Homo sapiens</i>	S	[37]
	Ernane	Goiás	<i>Homo sapiens</i>	S	[37]
	Gilmar	Minas Gerais	<i>Homo sapiens</i>	S	[37]
	MR	Rio Grande do Sul	<i>Triatoma infestans</i>	S	[37]
	São Felipe	Bahia	<i>Triatoma infestans</i>	S	[37]
	VL–10	Minas Gerais	<i>Homo sapiens</i>	R	[37]
	Y	São Paulo	<i>Homo sapiens</i>	MR	[37]
TcIII	C00113	Goiás	<i>Monodelphis domestica</i>	ND	–
	C00370	Pará	<i>Rhodnius pictipes</i>	ND	–
	C00566	Mato Grosso do Sul	<i>Dasybus novemcinctus</i>	ND	–
	PEBA18	Rio Grande do Norte	<i>Euphractus sexcinctus</i>	ND	–
	PL0213	Rio Grande do Norte	<i>Panstrongylus lutzi</i>	ND	–
	RN19	Rio Grande do Norte	<i>Panstrongylus lutzi</i>	ND	–
	SM76	Rio Grande do Norte	<i>Homo sapiens</i>	ND	–
	TcIV	AM64	Amazonas	<i>Homo sapiens</i>	MR
TcV	C00041	Mato Grosso do Sul	<i>Thrichomys pachyurus</i>	ND	–
	C00471	Mato Grosso do Sul	<i>Oecomys mamorae</i>	ND	–
	C00524	Mato Grosso do Sul	<i>Triatoma</i> spp.	ND	–
	C00526	Mato Grosso do Sul	<i>Triatoma</i> spp.	ND	–
	C00601	Espirito Santo	<i>Triatoma vitticeps</i>	ND	–
	3253	Rio Grande do Sul	<i>Homo sapiens</i>	ND	–
TcVI	Bug2149c110	Rio Grande do Sul	<i>Triatoma infestans</i>	R	[74]
	JM	Minas Gerais	<i>Homo sapiens</i>	S	[37]
	Buriti	Rio Grande do Sul	<i>Triatoma infestans</i>	S	[37]
TcVI	CL	Rio Grande do Sul	<i>Triatoma infestans</i>	S	[37]
	CL Brener clone	Rio Grande do Sul	<i>Triatoma infestans</i>	S	[37]
	FL	Rio Grande do Sul	<i>Triatoma infestans</i>	S	[37]
	Luna	Argentina ^c	<i>Homo sapiens</i>	S	[37]
	RS–12	Rio Grande do Sul	<i>Homo sapiens</i>	ND	–

MR Medium resistance, ND not determined, R resistant, S susceptible

^a Sus: in vivo drug susceptibility to benznidazole (BZ) and/or nifurtimox (NFX), as previously described [37, 39]

^b *T. cruzi* strain isolated from Colombia

^c *T. cruzi* strain isolated from Argentina

All *T. cruzi* strains used in the present study had been classified previously according to six DTUs (TcI–TcVI), as described elsewhere [2].

Epimastigotes of *T. cruzi* strains were maintained in liquid liver infusion tryptose medium at 28 °C [36]. Genomic DNA extraction from *T. cruzi* strains and subsequent electrophoresis of DNA fragments were carried out as previously described [21]. The in vivo susceptibility

to BZ and NFX of some *T. cruzi* strains have been previously characterized [37–40] (Table 1).

Identification of potential homologs

Searching for potential homologs of molecular targets is the first step in determining whether the molecular targets belong to a gene/protein family. The presence of multiple potential homologs in the genome and predicted

proteome of the different *T. cruzi* strains indicates that the target of the study belongs to a family. In this context, the *T. cruzi* proteomes were searched using the Pfam 34.0 identifiers to identify FeSOD potential homologs in UniProt, as reported previously [41]. Potential FeSOD homologs encoded in the genome of different *T. cruzi* strains were identified in TriTrypDB release 53 [30] using the Pfam [42] identifiers PF00081 and PF02777. *Trypanosoma cruzi* strains with more than one gene imply that FeSODs are members of a multigenic family.

FeSOD gene copy number

Analysis of the copy number of the genes encoding FeSOD-A and FeSOD-B was performed with all nucleotide sequences used in our phylogenetic reconstruction and the *T. cruzi* FeSOD-C gene sequence retrieved from the TriTrypDB (Additional file 2: Figure S2). Sequence similarity search against the *T. cruzi* reference CL Brener genome assembly was performed using reads obtained by two systems: the PacBio system [43] and the Illumina HiSeq system [44]. These genome data have not been published yet (DC Bartholomeu, personal communication).

The complete open reading frame of each gene was identified and translated into its corresponding amino acid sequence, and checked for the presence of internal stop codons. The predicted FeSOD genes, annotated

to each distinct gene, were obtained according to the matches found between our gene sequences and the new genome assembly. To confirm the annotated genes, we evaluated the read depth in the corresponding regions on the assembly. The short reads were mapped using the BWA-MEM algorithm [45]. For each genome, depth was measured by SAMtools [46] with mapping quality 30, and the depth and coverage of the FeSOD gene regions were calculated. The copy number of each FeSOD in the genome assembly was obtained according to the ratio between gene and genome depth.

Gene amplification and sequencing

FeSOD genes from the 35 *T. cruzi* strains, corresponding to the six DTUs TcI–TcVI, were sequenced (Table 1). Primers used to amplify the CDS sequence of the FeSOD-A and FeSOD-B genes are listed in Additional file 3: Table S1. FeSOD primers were designed based on the conserved nucleotide sequences of *T. cruzi* sequences shown in Table 2. All PCR amplifications were carried out using the Platinum[®] PCR SuperMix (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's protocol. PCR products of 637 bp (FeSOD-A) and 588 bp (FeSOD-B) from genomic DNA (Additional file 3: Figure S3) were separated by 1% agarose gel electrophoresis. Amplicons with the expected sizes were purified using the QIAquick[®] PCR purification

Table 2 Description of sequences in the datasets used for phylogenetic reconstruction

Species	Strain	Isoform ^a	UniProt identifiers	European Nucleotide Archive (ENA) identifiers	Reference Sequence (RefSeq) identifiers	Protein Data Bank (PDB) identifiers	Reference	Length (nt)	Sus ^b
<i>T. cruzi</i>	CL Brener clone	FeSOD-A	Q4DCQ3	EAN90306.1	XM_807064	4DVH 4H3E	[23] [75]	702	S
<i>T. cruzi</i>	Tulahuen clone 2	FeSOD-A	O02615	AAC47548.2	NA	NA	[19]	636	S
<i>T. cruzi</i>	Y clone 4	FeSOD-A	Q2TJ60	AAX84933.1	NA	NA	[21]	637	S
	Y clone 16	FeSOD-A	Q2TJ60	AAX84936.1	NA	NA	[21]	637	R
<i>T. cruzi</i>	17LER	FeSOD-A	Q2TJ65	AAX84930.1A	NA	NA	[21]	637	R
	17WTS	FeSOD-A	Q2TJ65	AX84931.1	NA	NA	[21]	637	S
	Barra Seca	FeSOD-A	Q2TJ65	AAX84932.1A	NA	NA	[21]	637	S
	YUYU	FeSOD-A	Q2TJ65	AX84938.1	NA	NA	[21]	637	R
<i>T. cruzi</i>	CL Brener clone	FeSOD-A	Q2TJ61	AAX84934.1A	NA	NA	[21]	637	S
	JA	FeSOD-A	Q2TJ61	AX84935.1AA	NA	NA	[21]	637	S
	São Felipe	FeSOD-A	Q2TJ61	X84937.1AAX	NA	NA	[21]	637	S
	VL-10	FeSOD-A	Q2TJ61	84939.1	NA	NA	[21]	637	R
<i>T. cruzi</i>	CL Brener clone	FeSOD-B	Q4DI29	EAN92179.1	XM_808937	2GPC	[76] [23]	588	S
<i>T. cruzi</i>	Tulahuen clone 2	FeSOD-B	O02616	AAC47549.1	NA	NA	[19]	588	S

MR Medium resistant, NA not applicable, R resistant, S susceptible

3D structure not available in PDB

^a FeSOD-A,-B: Iron superoxide dismutase isoform A and B, respectively

^b Sus: in vivo drug susceptibility to BZ and/or NFX, as previously described [37, 39]

Kit (Qiagen, Hilden, Germany). After the presence of FeSODs in the *T. cruzi* strains was confirmed, the purified PCR products were directly used for Sanger sequencing [47]. Each PCR amplification and sequencing were performed five times (2 technical and 3 biological replicates). For the internal primers, the procedure was performed twice (2 replicates). The Phred-Phrap-Consed package [48] was used for sequence assembly and processing.

Multiple sequence alignments

Two datasets containing potential FeSOD homologs were selected for analysis. These datasets include nucleotide sequences from *T. cruzi* obtained in the present study and *T. cruzi* FeSOD nucleotide sequences retrieved from public databases, such as the European Nucleotide Archive (ENA 2021) [49] and the Reference Sequence Database (RefSeq release 205) [50] (Table 2). Each FeSOD isoform (FeSOD-A and FeSOD-B) was analyzed separately. Nucleotide sequences of each dataset were aligned using MUSCLE [51] with default parameters as implemented in MEGA X package [52]. Multiple sequence alignments were manually edited and gaps were excluded to increase data quality. Conserved, variable and parsimony informative sites were identified in each alignment by using MEGA X. These sites were accessed to check the phylogenetic signal of each alignment. We applied Kimura 2-parameter (FeSOD-A dataset) and HKY85 (FeSOD-B dataset) as the best-fit models, as indicated by jModel-Test 2.1.10 [53]. For the two alignments, we estimated the proportion of invariable sites.

Phylogenetic reconstruction

Edited sequence alignments were used for phylogenetic reconstruction by applying two character-based methods. For the maximum likelihood method implemented in PhyML [54], bootstrap values were obtained from 1000 pseudoreplicates. For the Bayesian inference implemented in MrBayes 3.2.7 [55], a variant of the Markov chain Monte Carlo (MCMC) method was used. MCMC analyses were run as four chains (1 cold and 3e heated) for 10,000,000 generations and sampled every 100 generations. Of the initial samples, 25% were discarded as “burn-in.” Support values for Bayesian inference were estimated as Bayesian posterior probabilities. The average standard deviation of split frequencies (ASDSF) and the potential scale reduction factor (PSRF) were evaluated in Bayesian trees. ASDSF < 0.01 suggests that the two independent sessions become increasingly similar trees. A PSRF of approximately 1 indicates that the generation of trees converged. Additionally, an estimated sample size (ESS) > 100 ensures that the parameters adopted are not

subsampled. Evolutionary trees were rooted using the midpoint method and edited in FigTree 1.4.4 [56].

Identification of potential drugs interacting with FeSOD

DrugBank is a unique bioinformatics and cheminformatics database that combines chemical and pharmacological drug properties with sequence and structural information associated with potential target pathways [57]. This database contains drugs with experimental data (mass spectrometry and nuclear magnetic resonance), drugs in phases I/II/III of investigation and drugs approved by the US Food and Drug Administration (FDA), Health Canada, European Medicines Agency (EMA) and other national agencies. All nucleotide sequences included in the present study were translated into protein sequences and used in the DrugBank 5.1.4 search tool to identify drugs that potentially interact with *T. cruzi* FeSODs. Those drugs identified as potentially interacting with *T. cruzi* FeSODs were tested in vitro against amastigotes and trypomastigotes based on toxicity profiles and pharmacological properties.

Evaluation of the in vitro anti-*T. cruzi* activity of selected drugs, cellular toxicity and selectivity

The in vitro anti-*T. cruzi* activity was evaluated on L929 cells (mouse fibroblasts) infected with the Tulahuén strain of the parasite expressing the *Escherichia coli* β -galactosidase as reporter gene, according to the method described previously [58]. This assay allows evaluation of anti-*T. cruzi* activity of drugs against both the amastigote and trypomastigote forms of the parasite.

Polaprezinc, a zinc-related medicine, and mangafodipir, a contrast agent used in magnetic resonance imaging (both from MedChemExpress [MCE], Monmouth Junction, NJ, USA), were tested at concentrations ranging from 62.5 to 1000 μ M, for an incubation period of 96 h. Each dilution was tested in triplicate. The controls were uninfected cells, untreated infected cells and infected cells treated with benznidazole at 1 μ g/ml (3.8 μ M, positive control) or DMSO (1%, v/v). The results were expressed as the percentage of *T. cruzi* growth inhibition in drug-tested cells as compared to the infected cells and untreated cells, and IC₅₀ values (concentration that inhibits 50% of the growth of the parasites) were calculated by linear interpolation. Active drugs were evaluated for cytotoxicity and selectivity on uninfected fibroblasts [58]. The results were expressed as the difference in the reduction percentage among treated and untreated cells, and the CC₅₀ determined (drug concentration that inhibits 50% of the

L929 cell viability). The selectivity index (SI) was calculated as the ratio of the CC_{50} value in the L929 cells to the IC_{50} value of *T. cruzi* cells.

Results

Identification of potential FeSOD family members

FeSODs have a conserved domain architecture according to Pfam. Most *T. cruzi* FeSOD enzymes have one N-terminal (PF00081) and one C-terminal (PF02777) domain. To identify FeSOD family members in *T. cruzi*, we used the respective Pfam identifiers to search the UniProt (proteome data) and TriTrypDB (genomic data) databases and found that the number of potential gene/protein homologs identified varied across different *T. cruzi* strains.

Pfam identifiers were used to search for the potential FeSOD homologs in the proteome of the *T. cruzi* CL-Brener (UniProt: UP000002296) [59], Dm28c (UP000246121) [60] and TCC (UP000246078) [60] strains available in the UniProt database (February 2021). The search for the two Pfam domains (PF00081 and PF02777) in the *T. cruzi* FeSOD sequences resulted in the recovery of a total of 9, 7 and 11 proteins in the predicted proteomes, respectively. The search for *T. cruzi* FeSOD sequences in the TriTrypDB database for these domains showed 13, 9 and 14 sequences in the three genomes, respectively (Table 3). No sequence analyzed in the present study has only the PF00081 domain. On the other hand, searching only for the PF02777 domain showed four, two and two genes in the three genomes, respectively. These results and the number of the genes encoding FeSODs in the different strains (Table 3) suggest the existence of *T. cruzi* FeSODs with only the PF02777 domain and that *T. cruzi* FeSODs are members of a gene/protein family. Altogether, these results may highlight processes shaping the evolution of *T. cruzi* FeSODs.

Estimating FeSOD gene copy number

The *T. cruzi* CL-Brener reference genome sequence currently available at the TriTrypDB database is fragmented and contains some inaccuracies [59]. To better estimate the complete repertoire of FeSOD genes in *T. cruzi* CL-Brener, we searched for these sequences in a PacBio- and Illumina-based assembly. This analysis revealed the presence of two FeSOD-A and four FeSOD-B genes. Sequences from these two distinct genes differ primarily by the presence of an extension at the 5' end in the FeSOD-A gene, which is absent in the FeSOD-B gene. The FeSOD-A gene correspondences are located on two different scaffolds (TcBrS006 and TcBrS020) with high similarity to each other. On the other hand, the FeSOD-B gene correspondences were found on four different scaffolds (TcBrS024, TcBrS074, TcBrS110 and TcBrS188). In TcBrS024 and TcBrS110, we observed genes with high similarity and longer length at the 3' end as compared to the TcBrS074 and TcBrS188 sequences, which are also highly similar to one another. With respect to FeSOD-C, two gene correspondences were found on scaffold TcBrS091 and two other correspondences on scaffold TcBrS112. Analysis of read depth and coverage confirmed the predicted annotated FeSOD genes of each distinct gene (GenBank: MZ825448-MZ825457). We detected complete coverage (100%) in all cases. The mean and normalized depth (gene/genome depth) were represented here (Additional file 3: Table S2). We confirmed the presence of two copies of FeSOD-A genes, four copies of the FeSOD-B and four copies of the FeSOD-C genes.

FeSOD multiple sequence alignments

The FeSOD-A and FeSOD-B genes of 35 *T. cruzi* strains (GenBank: OL620009-OL620078) were amplified by PCR and sequenced as described in the [Methods](#) section. All

Table 3 *T. cruzi* FeSOD sequences containing the Pfam domains PF00081 and/or PF02777

<i>T. cruzi</i> strain	Only the PF00081 domain	Only the PF02777 domain	Both the PF00081 and PF02777 domains	Number of sequences analyzed
Brazil A4	0	2	5	7
CL-Brener Clone Esmeraldo-like/Non-Esmeraldo-like	0	4	9	13
Dm28c 2014	0	1	2	3
Dm28c 2017	0	2	7	9
Dm28c 2018	0	2	7	9
Marinkellei strain B7	0	2	2	4
Sylvio X10/1-2012	0	1	4	5
TCC	0	2	12	14
YC6	0	1	8	9

Pfam domains: PF00081 (alpha-hairpin domain) and/or PF02777 (C-terminal domain) as identified in the TriTrypDB database

T. cruzi strains presented one amplicon for the FeSOD-A gene (approx. 637 bp) and one amplicon for the FeSOD-B gene (approx. 588 bp). Sequence assembly data confirmed that most of the total gene length for each FeSOD type was recovered (Additional file 3: Table S3).

Two datasets of nucleotide sequences were aligned (Additional file 4: Figure S4) and submitted to phylogenetic inference analysis: dataset I (46 *T. cruzi* FeSOD-A sequences with 573 sites) and dataset II (36 *T. cruzi* FeSOD-B sequences with 484 sites). The Tulahuen genes (FeSOD-A and FeSOD-B) were removed because they seemed to create tree artifacts. Analyses of these two datasets revealed the nucleotide diversity of FeSOD genes across the different *T. cruzi* strains analyzed here.

The alignment between the FeSOD-A and FeSOD-B genes revealed a high conservation of nucleotide sequences of each distinct gene. However, despite the sequence conservation, each dataset had enough phylogenetic signal to be used in the tree reconstruction. The best-fit model for each sequence alignment was estimated by jModelTest 2.1.10 [53]. The Kimura 2-parameter was estimated for dataset I and HKY85 was estimated for dataset II. The proportion of invariable sites was estimated.

A comparison by similarity among the sequences used in phylogenetic reconstruction (FeSOD-A and FeSOD-B) and FeSOD-C genes (used to determine the copy number in *T. cruzi* CL Brener genome) is shown in Additional file 5: Figure S5. The FeSOD-C sequences TcBrA4_0028220, TcCLB.511737.3 and Tc_MARK_2024 were not inserted into the alignment because they do not include the sequence code of the PF00081 domain. Information on all of these sequences is available in Additional file 6: Table S4.

Phylogeny of *T. cruzi* FeSOD genes

Bayesian- and maximum likelihood-based phylogenies were reconstructed with sequences obtained in the present study and other *T. cruzi* FeSOD sequences retrieved from public databases. Both methods retrieved similar tree topologies for the two datasets analyzed here (Additional file 7: Figure S6).

The phylogenetic tree of the *T. cruzi* FeSOD-A sequences have two main clades (A35_CLADE and A11_CLADE) with high statistical support values that may represent two gene subtypes (Fig. 1). Similar results were obtained for the *T. cruzi* FeSOD-B gene tree (Fig. 2) with two main clades (B23_CLADE and B13_CLADE) with high statistical support values. The latter results suggest for the first time the existence of two functional subtypes of the FeSOD-B gene.

The average standard deviation of all split frequencies and the potential scale reduction factor of the FeSOD-A gene tree were 0.009862 and 1.001, respectively. For the FeSOD-B gene tree, these values were 0.009909 and 1.001. To optimize the PSRF, we sampled 10,000,000 generation every 100 generations. A PSFR close to 1 indicates that generations have converged. When the estimated sample size is > 100, the indication is that the parameters have not been subsampled.

We did not observe congruence between the parasite host and geographic location with the evolutionary relationships presented in each phylogeny. Evolutionary relationships of the *T. cruzi* FeSOD gene families (FeSOD-A and FeSOD-B) show a monophyletic group formed by genes of the TcIV *T. cruzi* strains. The common ancestor among these genes may reflect the natural history of *T. cruzi* (Figs. 1, 2).

In summary, the FeSOD-B gene tree shows better statistical support by both phylogenetic methods than the FeSOD-A gene tree. Therefore, the evolutionary relationships among FeSOD-B genes are better resolved compared to those of FeSOD-A genes. Gene family trees show relationships among genes and not taxa (Figs. 1, 2).

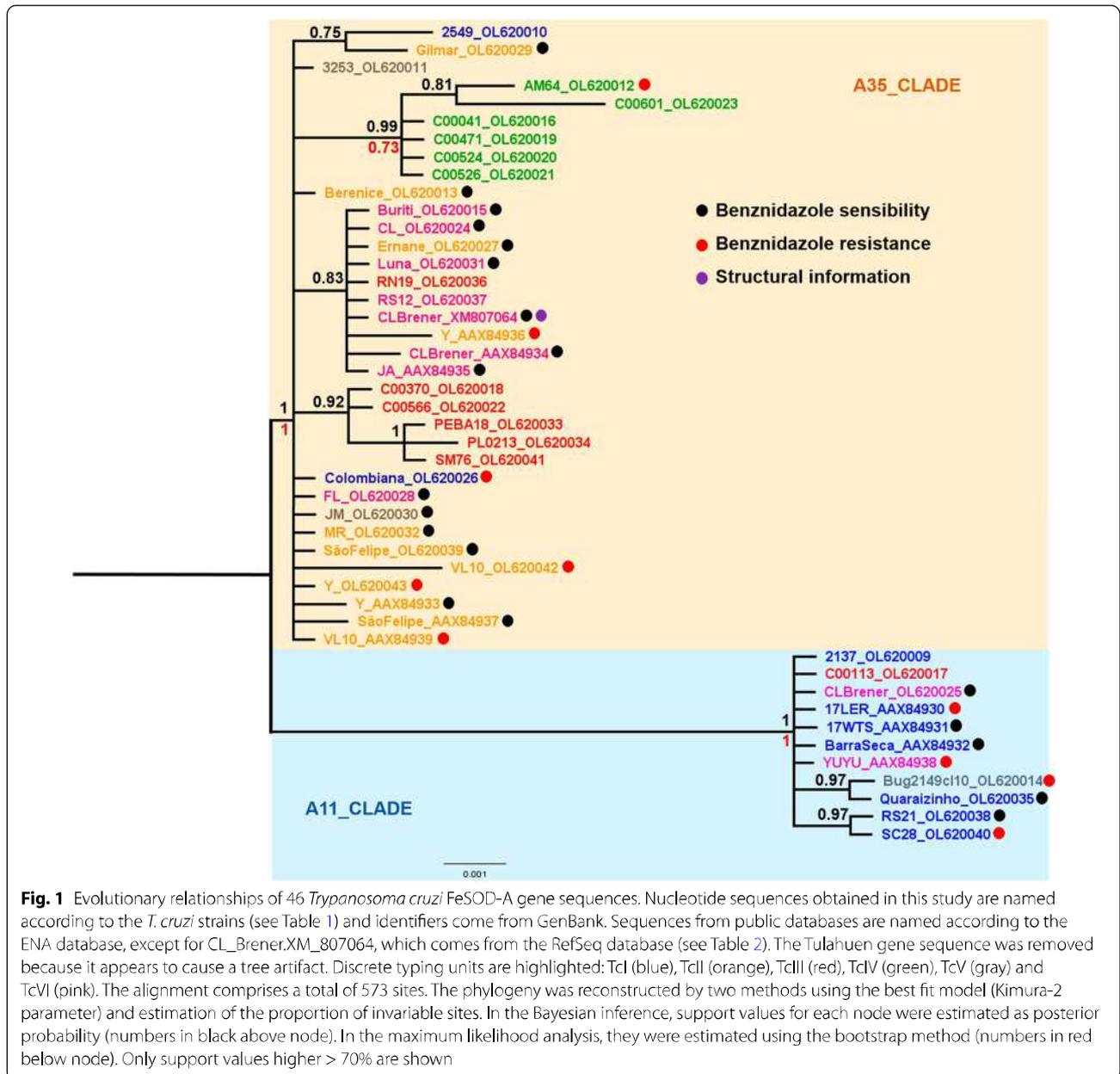
Tree annotations are based on experimental evidence of some sequences described elsewhere. Experimentally characterized genes can be used to predict some functional features of uncharacterized ones present in the same clade (Figs. 1, 2).

Selection of drugs interacting with FeSOD

Amino acid sequences from FeSOD-A and FeSOD-B genes sequenced in the present study and those retrieved from the UniProt database were used to search DrugBank for chemical drugs that can interact with these sequences. Two drugs that potentially interact with *T. cruzi* FeSODs were identified and tested in vitro against amastigotes and trypomastigotes as described in the [Methods](#) section. Mangafodipir had a low trypanocidal effect and polaprezinc was inactive against the parasite.

Polaprezinc is a chelated form of zinc and L-carnosine that shows therapeutic activity for the treatment of pressure ulcers and other intestinal lesions [61, 62], is used in cancer chemotherapy [63, 64], presents therapeutic effects on cardiac function [65] and has a protective effect against respiratory diseases [66].

Mangafodipir is a manganese chelate responsible for releasing free manganese ions into the blood. This drug is used as a contrast agent in diagnostics [67]. It showed promising results as a cytoprotectant during the treatment of heart diseases and neuropathies [67].



In vitro trypanocidal activity of drugs interacting with FeSOD

Potential FeSOD interacting drugs were assayed against amastigotes and trypomastigotes of the *T. cruzi* Tulahuen strain. Polaprezinc at concentrations of 1000, 500, 250 and 125 μM caused cell death of fibroblasts (Additional file 8: Table S5). At a concentration of 62.5 μM it showed only 14% trypanocidal activity. Thus, this drug was considered to be inactive against *T. cruzi*. Mangafodipir caused a reduction in the parasite population, but the trypanocidal effect (69%) occurred at the

highest concentration (1000 μM), with a high IC_{50} value of 839 μM . In addition, it was also cytotoxic against mouse fibroblasts L929 cells with CC_{50} value of 2298 μM . Thus, this drug was not approved for in vivo testing because it exhibits a low selectivity towards parasites (SI: 2.7) (Additional file 8: Table S5).

Discussion

The antioxidant defense system in trypanosomatids is composed of many enzymes that act in concert against various oxidants. FeSODs are important enzymes in this

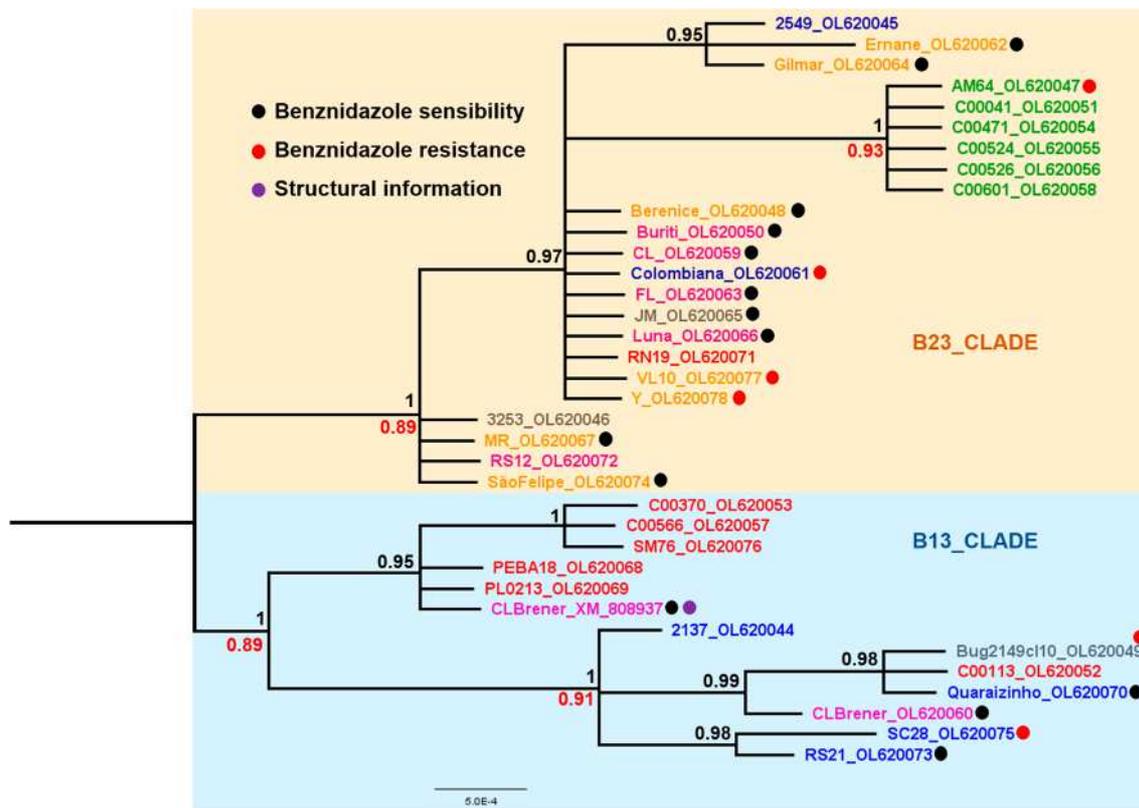


Fig. 2 Evolutionary relationships of 36 *T. cruzi* FeSOD-B gene sequences. Nucleotide sequences obtained in this study are named according to the *T. cruzi* strains (see Table 1) and identifiers come from GenBank. Sequences from public databases are named according to the strain. Identifiers come from the RefSeq database (CL_Brenner.XM_808937) (see Table 2). The Tulahuén gene sequence was removed because it appears to cause a tree artifact. Discrete typing units are highlighted: TcI (blue), TcII (orange), TcIII (red), TcIV (green), TcV (gray) and TcVI (pink). The alignment comprises a total of 484 sites. The phylogeny was reconstructed by two methods using the best fit model (HKY85) and estimation of the proportion of invariable sites. In the Bayesian inference, support values for each node were estimated as posterior probability (number in black above node). In the maximum likelihood analysis, they were estimated using the bootstrap method (numbers in red below node). Only support values >70% are shown

system. In the present study, we investigated the molecular biodiversity and evolutionary relationships of FeSODs in different *T. cruzi* strains, including searches of different public databases. Our results suggest that *T. cruzi* FeSODs are members of gene/protein superfamilies.

Knowledge of multigene family members improves understanding of the origin and evolution of genes and gene products. Moreover, such knowledge may provide information for the functional prediction of uncharacterized genes and, subsequently, for the development of therapeutic strategies involving these genes. Homologous genes and proteins may perform identical, similar, or complementary functions. Therefore, it is important that drug candidates interact with all members of multigene families to ensure the trypanocidal effect.

Regarding the number of copies of FeSODs genes in the *T. cruzi* CL-Brenner genome, our results show two copies of the FeSOD-A gene, four copies of the FeSOD-B gene,

with two similar pairs, and four copies of the FeSOD-C gene. These results agree with those of a previous analysis that showed the presence of two FeSOD-A and four FeSOD-B gene copies in *T. cruzi* Tulahuén clone 2 [19]. Two copies of FeSOD-A were also found in the 17WTS strain [21]. In the present study, the amino acid sequences encoded by the FeSOD-A and FeSOD-B genes in the *T. cruzi* CL-Brenner were found to share 69% similarity.

We constructed a diagram showing the differences among the FeSOD-A, -B and -C genes. For building the diagram, one sequence of each FeSOD type was chosen. The selection was done based on the sequences that contained more information in the literature (sequences with greater reliability). We also added information obtained for the predicted gene copy number in the *T. cruzi* CL-Brenner genome: two copies (FeSOD-A) or four copies (FeSOD-B and FeSOD-C). In general, information available in the literature and public databases is scarce. In

this context, our work provides a better understanding of these proteins in *T. cruzi* (Additional file 8: Figure S7).

In order to reconstruct the phylogenetic history of FeSODs using gene sequences of different *T. cruzi* strains, we investigated two different isoforms (FeSOD-A and FeSOD-B) present in this parasite. The main difference found between the FeSOD-A and FeSOD-B genes is at the 5' end, where a portion composed of 15 amino acids is present in the former and absent in the latter. This N-terminal extension depicts an overall pattern of a mitochondrial signal peptide [19]. Our datasets also reveal a high similarity among the FeSOD-A and FeSOD-B genes separately. Our phylogenetic inferences for the *T. cruzi* FeSOD-A and FeSOD-B genes are represented by trees with two main clades which suggest the existence of two subtypes of each FeSOD type (Figs. 1, 2). This diverse enzymatic profile in different cell locations ensures a more effective action against oxidants [20, 68, 69]. Dufernez et al. [16] reconstructed the evolutionary history among amino acid sequences of FeSODs from *Trypanosoma brucei* and other organisms. Their phylogenetic relationship suggests that FeSODs of subtypes B1 and B2 emerged independently from specific ancestors by gene duplication in each species of the database (*T. brucei*, *T. congolense*, *T. cruzi*, *T. vivax*, and *Leishmania* species). In *Leishmania* species, types B1 and B2 are recovered in separate clades, while in *Trypanosoma* species these proteins are brought together in a single clade. While such topology may be explained as the result of gene duplications, which occurred independently in *Trypanosoma* species and strains, such an evolutionary scenario is unlikely.

Dufernez et al. [16] suggest the existence of a correlation among FeSODs. These authors propose the occurrence of more than one lateral gene transfer event that gave rise to multiple FeSODs in *T. brucei* [16]. Based on the results of the present study, we also propose that the two possible functional variants of FeSOD-A and FeSOD-B originated by duplication events followed by divergence.

We did not identify congruences by geographic region and host isolation of *T. cruzi* strains in the FeSOD gene trees (Figs. 1, 2). In contrast, we observed a clade well supported by statistical values, with a monophyletic group composed of all FeSOD-A and FeSOD-B genes from the TcIV *T. cruzi* strains in each phylogeny. It has been proposed [70] proposed the origin of the TcIV *T. cruzi* DTU group is due intraspecific hybridization events between DTUs TcI and TcII, generating the ancestral ecotypes of DTUs TcIII and TcIV. The *T. cruzi* TcIV strains contain several specific characteristics: (i) they are predominantly present in the Amazon region, where they mainly infect non-human primates; (ii) they

exhibit a high virulence within a short pre-patent period in infected mice, producing wide tissue-tropism toward skeletal muscle, high parasitemia and mortality rates in the acute phase of infection [71].

We believe that these specific characteristics may reflect the common ancestry among FeSODs of TcIV *T. cruzi* strains. FeSODs are essential for the parasite to survive and for the infectious processes, suggesting that the evolution of these enzymes is aligned with the evolution of *T. cruzi*. More specifically, we propose that the set of evolutionary mechanisms which shaped the evolution of genes encoding FeSODs in the TcIV strains are plesiomorphic, as the ancestor that originated these *T. cruzi* strains diverged. In this context, our results corroborate those of previous studies using a multilocus sequence typing (MLST) scheme for *T. cruzi* genetic typing [28]. Using this approach, the authors analyzed 10 house-keeping genes, including FeSOD-A and FeSOD-B genes. These sequences are from 32 different *T. cruzi* strains belonging to six DTUs, and the phylogenetic tree displays every DTU as a monophyletic group [28]. It was only possible to obtain a monophyletic group of the TcIV *T. cruzi* strains when using four loci, including fragments of the FeSOD-B genes [28]. Together, these complementary results show that genotypic differences in FeSOD genes can define the phylogenetic signal that classifies TcIV *T. cruzi* strains.

Our dataset includes sequences that were used in studies that show important FeSOD roles in *T. cruzi* antioxidant defense against reactive oxygen and nitrogen species. FeSODB protects *T. cruzi* against peroxynitrite toxicity inside the phagosome by preventing its formation or by its reacting directly with the oxidant [69]. Previous studies showed that FeSODs favor the proliferation, survival and virulence of *T. cruzi*. [26, 27].

In the present study, we did not observe any correlation between the drug-resistant and drug-susceptible phenotype of *T. cruzi* strains analyzed in relation to the different clades of the phylogenetic trees. In the FeSOD-A and FeSOD-B trees, well-supported clades contain strains/clones showing different susceptibilities to BZ. Other studies investigating the expression and specific enzyme activity developed by our group have highlighted the strong indications that FeSODs are associated with the drug resistance mechanism used by *T. cruzi* [21, 39].

In this study, our search of the DrugBank database resulted in the identification of two drugs, mangafodipir and polaprezinc, that potentially interact with *T. cruzi* FeSODs. The in vitro activity of both drugs against trypanomastigote and amastigote *T. cruzi* forms was evaluated. Polaprezinc was inactive against *T. cruzi*, and mangafodipir exhibited a low trypanocidal effect and low selectivity against *T. cruzi*. Although the drugs tested in vitro

were not promising, the high conservation observed among the *T. cruzi* FeSOD gene sequences (Additional file 4: Figure S4) and the absence of FeSODs in humans that have manganese (MnSOD) or copper and zinc (Cu-ZnSODs) as a prosthetic group indicate the high potential of this enzyme as a target of new drugs. Literature data have shown that benzo[g]phthalazine and phthalazine derivatives are active against *T. cruzi* and show selective inhibitory effects on *T. cruzi* FeSOD enzyme activity in comparison with human CuZn-SOD [72, 73].

Conclusions

Our phylogenetic inference study suggests the existence of two functional variants of each FeSOD analyzed across *T. cruzi* strains. We believe that these variants have been differentiating through duplication events followed by divergence over evolutionary time. This hypothesis is exclusive and well supported by other studies that indicate that the parasite needs several enzymes to provide efficient antioxidant protection in different cellular compartments. FeSOD genes of TcIV *T. cruzi* strains studied here belong to a monophyletic group, suggesting that the phylogenetic history of this DTU reflects the evolution of FeSODs. In future studies, we intend to reconstruct the phylogenetic history of other members of the *T. cruzi* antioxidant defense system. Additionally, we want perform in vitro testing against the parasite with other drugs that interact with these proteins, with the aim to find a new therapeutic agent against *T. cruzi*.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05319-2>.

Additional file 1: Figure S1. Nucleotide sequences (FeSOD-A and FeSOD-B genes) of the datasets used in this study.

Additional file 2: Figure S2. Alignment of sequences of potential *T. cruzi* FeSOD-C.

Additional file 3: Table S1. Primers to amplify *T. cruzi* FeSOD-A and FeSOD-B genes. Abbreviations: Temp, Predicted annealing temperature.

Figure S3. PCR amplification products of FeSOD-A and FeSOD-B genes of 8 *T. cruzi* strains. Electrophoresis was performed in a 1% agarose gel stained with GelRed™ (Biotium). The molecular weight markers 1-kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) were used. Abbreviations: NC, Negative control of reaction without template. **Table S2.** Data of read depth and coverage analysis. The depth read values and coverage proportion in the genomic regions (GenBank: MZ825448–MZ825457) for each FeSOD type of genes and the respective normalized value (gene/genome depth). Depth was calculated using the value for each position of the gene. The coverage corresponds to the proportion of position that has reads in the gene, and normalized values are the depth of the genes divided by the mean of genome depth. **Table S3.** Sequence assembly information. Reads refers to the number of reads used for sequence assembly; Consensus refers to the length (nt) of the consensus sequence. Sequence assembly was performed using Phred-Phrap-Consed.

Additional file 4: Figure S4. Nucleotide sequence alignment of the datasets used in this study. Alignments were performed in MUSCLE as implemented in MEGA and edited by visual inspection. Different types of

sites identified in each alignment are indicated in Table S1. Each edited alignment was further used for phylogenetic reconstruction.

Additional file 5: Figure S5. Alignment of sequences of the trees reconstructed in this study (FeSOD-A and FeSOD-B sequences), Tulahuen gene sequences (FeSOD-A and FeSOD-B sequences) and FeSOD-C genes (used to determine the copy number in the *T. cruzi* CL-Brener genome).

Additional file 6: Table S4. Information of sequences of the trees reconstructed in this study (FeSOD-A and FeSOD-B sequences) and FeSOD-C genes (used to determine the copy number in the *T. cruzi* CL-Brener genome).

Additional file 7: Figure S6. Trees of the datasets used in this study. Trees were reconstructed in MrBayes and PhyML.

Additional file 8: Table S5. In vitro trypanocidal activity, cytotoxicity and selectivity index of selected drugs. Superscripts: ¹Reduction (%) of the amastigote and trypomastigote by drug; ²drug concentration that inhibits 50% of the growth of the amastigotes and trypomastigotes of *T. cruzi*; ³drug concentration that inhibits 50% of the L929 cell viability; ⁴CC₅₀ L929/IC₅₀ *T. cruzi*. IC₅₀ and CC₅₀ values were calculated by linear interpolation. The determination of CC₅₀ of polaprezinc was not possible due low solubility in concentrations > 50 µM. Abbreviations: ND, Not determined.

Fig. S7. The diagram illustrates FeSOD-A, FeSOD-B and FeSOD-C characteristics, including cellular localization (orange boxes), protein length (blue boxes), gene copies (green boxes) and protein domains (pink boxes). Information was retrieved from public databases and tools: ENA, Pfam, TriTrypDB, and UniProt. Reference sequences were selected for FeSOD-A (AAC47548.2), FeSOD-B (EAN92179.1) and FeSOD-C (TcCLB.5111735.60). Only gene copy numbers were obtained by our prediction using the *T. cruzi* CL-Brener genome.

Acknowledgements

We thank Dr Bianca Zingales (USP) for kindly providing one *T. cruzi* strain (Bug2149c110) for this study. The authors are grateful to Dr Egler Chiari (deceased) and Dr Zigman Brener (deceased) for providing *T. cruzi* samples. We thank the Program for Technological Development of Tools for Health-PDTIS-Fiocruz for use of its facilities (Chagas disease-PlaBio Tc and Sequencing Platform) of the Institute René Rachou FIOCRUZ Minas. We are also grateful to Dr Jeronimo Conceição Ruiz (FIOCRUZ Minas) for the use of his computer facilities.

Author contributions

JH conducted and performed experiments and wrote the manuscript. LFAA, TGM, PASJ and ACS performed experiments. SMFM, LMCG, ACJC, DCB and RCMS provided samples and resources. SMFM and LAN designed the project, coordinated the study and wrote and reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work received financial support from the following agencies: Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES; DCB: 23038.004631/2014-80); INOVA FIOCRUZ program-Oswaldo Cruz Foundation (SMFM: VPPCB-007-FIO-18-2-94); Minas Gerais Research Funding Foundation (FAPEMIG; SMFM: FAPEMIG-APQ-02816-21; CBB-AUC 00030-15; DCB: APQ-01822-18; RCMS: AUC-00030-15); National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) SMFM: 304158/2019-4. Graduate student fellowships were provided by the FIOCRUZ Vice-Presidency of Education, Information and Communication (FIOCRUZ/VPEIC; JH: no process number). PASJ was a research fellow supported by the Graduate Program in Health Sciences, FIOCRUZ Minas (CAPES/PNPD)-grant number 88882.317220/2019-01. LMCG, ACJC, DCB and SMFM are supported by CNPq.

Availability of data and materials

Datasets used in the present study are available in the additional files. Sequences were deposited in GenBank (MZ825448–MZ825457) and (OL620009–OL620078).

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors ensure that they have no known competing financial interests or personal relationships that would appear to interfere in this work.

Author details

¹René Rachou Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Functional genomics of parasites group; Biosystems informatics, bioengineering and genomic group), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. ²Department of Genetics, Ecology and Evolution, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. ³Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Rio Grande do Norte State, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. ⁴Promove College of Technology, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Received: 22 December 2021 Accepted: 10 May 2022

Published online: 06 June 2022

References

- WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). 2020. <https://www.who.int/health-topics/chagas-disease>. Accessed 27 Jul 2020.
- Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:1051–4.
- Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol*. 2012;12:240–53.
- Hamilton PB, Lewis MD, Cruickshank C, Gaunt MW, Yeo M, Llewellyn MS, et al. Identification and lineage genotyping of South American trypanosomes using fluorescent fragment length barcoding. *Infect Genet Evol*. 2011;11:44–51.
- Sales Junior PA, Molina I, Fonseca SMM, Sánchez-Montalvá A, Salvador F, Corrêa-Oliveira R, et al. Experimental and clinical treatment of Chagas disease: a review. *Am J Trop Med Hyg*. 2017;97:1289–303.
- Cançado JR. Criteria of Chagas disease cure. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94:331–5.
- Sguassero Y, Cuesta CB, Roberts KN, Hicks E, Comandé D, Ciapponi A, et al. Course of chronic *Trypanosoma cruzi* infection after treatment based on parasitological and serological tests: a systematic review of follow-up studies. *PLoS ONE*. 2015;10:0139363.
- Molina I, Salvador F, Montalvá AS, Treviño B, Serre N, Avilés AS, et al. Toxic profile of benznidazole in patients with chronic Chagas disease: risk factors and comparison of the product from two different manufacturers. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59:6125.
- Santi AMM, Silva PA, Santos IFM, Murta SMF. Downregulation of FeSOD-A expression in *Leishmania infantum* alters trivalent antimony and miltefosine susceptibility. *Parasit Vectors*. 2021;14:366.
- Ferrer-Sueta G, Radi R. Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chem Biol*. 2009;4:161–77.
- Plewes KA, Barr SD, Gedamu L. Iron superoxide dismutases targeted to the glycosomes of *Leishmania chagasi* are important for survival. *Infect Immun*. 2003;71:5910–20.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969;244:6049–65.
- Neto VG, Ribeiro PR, Del-Bem LE, Bernal DT, Lima ST, Ligterink W, et al. Characterization of the superoxide dismutase gene family in seeds of two *Ricinus communis* L. genotypes submitted to germination under water restriction conditions. *Environ Exp Bot*. 2018;155:453–63.
- Fridovich I. Superoxide dismutases. *J Biol Chem*. 1989;264:7761–4.
- Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R, Culotta VC. A fraction of yeast Cu, Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. *J Biol Chem*. 2001;276:38084–9.
- Dufernez F, Yernaux C, Gerbod D, Noel C, Chauveneta M, Wintjens R, et al. The presence of four iron-containing superoxide dismutase isozymes in Trypanosomatidae: characterization, subcellular localization, and phylogenetic origin in *Trypanosoma brucei*. *Free Radic Biol Med*. 2006;40:210–25.
- Turrens JF. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Mol Aspects Med*. 2004;25:211–20.
- Wilkinson SR, Prathalingam SR, Taylor MC, Ahmed A, Horn D, Kelly JM, et al. Functional characterization of the iron superoxide dismutase gene repertoire in *Trypanosoma brucei*. *Free Radic Biol Med*. 2006;40:198–209.
- Ismail SO, Paramchuk W, Skeiky YAW, Reed SG, Bhatia A, Gedamu L. Molecular cloning and characterization of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1997;86:187–97.
- Villagrán ME, Marín C, Rodríguez-González I, de Diego JA, Sánchez-Moreno M. Use of an iron superoxide dismutase excreted by *Trypanosoma cruzi* in the diagnosis of Chagas disease: seroprevalence in rural zones of the state of Queretaro Mexico. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73:510–6.
- Nogueira FB, Krieger MA, Nirdé P, Goldenberg S, Romanha AJ, Murta SM. Increased expression of iron-containing superoxide dismutase-A (TcFeSOD-A) enzyme in *Trypanosoma cruzi* population with *in vitro*-induced resistance to benznidazole. *Acta Trop*. 2006;100:119–32.
- Sanz AM, Gómez-Contreras F, Navarro P, Sánchez-Moreno M, Boutaleb-Charki S, Campuzano J, et al. Efficient inhibition of iron superoxide dismutase and of *Trypanosoma cruzi* growth by benzo[g]phthalazine derivatives functionalized with one or two imidazole rings. *J Med Chem*. 2008;51:1962–6.
- Martínez A, Peluffo G, Petruk AA, Hugo M, Piñeyro D, Demicheli V, et al. Structural and molecular basis of the peroxynitrite-mediated nitration and inactivation of *Trypanosoma cruzi* iron-superoxide dismutases (FeSODs) A and B. *J Biol Chem*. 2014;289:12760–78.
- Mateo H, Marín C, Pérez-Cordón G, Sánchez-Moreno M. Purification and biochemical characterization of four iron superoxide dismutases in *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103:271–6.
- Fracasso M, da Silva AD, Bottari NB, Monteiro SG, Garzon LR, de Souza LAF, et al. Resveratrol impacts in oxidative stress in liver during *Trypanosoma cruzi* infection. *Microb Pathog*. 2021;153:104800.
- Piacenza L, Irigóin F, Alvarez MN, Peluffo G, Taylor MC, Kelly JM, et al. Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. *Biochem J*. 2007;403:323–34.
- Estrada D, Specker G, Martínez A, Dias PP, Hissa B, Andrade LO, et al. Cardiomycocyte diffusible redox mediators control *Trypanosoma cruzi* infection: role of parasite mitochondrial iron superoxide dismutase. *Biochem J*. 2018;475:1235–51.
- Lauthier JJ, Tomasini N, Barnabé C, Rumi MMM, D'Amato AMA, Ragone PG, et al. Candidate targets for multilocus sequence typing of *Trypanosoma cruzi*: validation using parasite stocks from the Chaco region and a set of reference strains. *Infect Genet Evol*. 2012;12:350–8.
- Nahum LA, Pereira SL. Phylogenomics, protein family evolution, and the tree of life: an integrated approach between molecular evolution and computational intelligence. In: Smolinski TG, Milanova MG, Hassanien AE, editors. *Studies in computational intelligence (SCI)*. Heidelberg: Springer SBS; 2008. p. 259–79. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-78534-7>.
- Aslett M, Aurrecochea C, Berriman M, Brestelli J, Brunk BP, Carrington M, et al. TryTripDB: a functional genomic resource for the trypanosomatidae. *Nucleic Acids Res*. 2010;38:D457–62.
- Cuesta-Astroz Y, Scholte LLS, Pais FS, Oliveira G, Nahum LA. Evolutionary analysis of the cystatin family in three *Schistosoma* species. *Front Genet*. 2014;5:206.
- Valdivia HO, Scholte LL, Oliveira G, Gabaldón T, Bartholomeu DC. The *Leishmania* metaproteome: a comprehensive survey of *Leishmania* protein phylogenetic relationships. *BMC Genomics*. 2015;16:887.
- Mitchell JB. Enzyme function and its evolution. *Curr Opin Struct Biol*. 2017;47:151–6.

34. Scholte LLS, Mourão MM, Pais FS, Melesina J, Robaa D, Volpini AC, et al. Evolutionary relationships among protein lysine deacetylases of parasites causing neglected diseases. *Infect Genet Evol.* 2017;53:175–88.
35. Anisimova M, Liberles DA, Philippe H, Provan J, Pupko T, von Haeseler A. State-of-the-art methodologies dictate new standards for phylogenetic analysis. *BMC Evol Biol.* 2013;13:161.
36. Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1964;6:93–100.
37. Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987;81:755–9.
38. Toledo MJO, Bahia MT, Carneiro CM, Martins-Filho OA, Tibayrenc M, Barnabé C, et al. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:223–30.
39. Murta SMF, Gazzinelli RT, Brener Z, Romanha AJ. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol Biochem Parasitol.* 1998;93:203–14.
40. Teston APM, Monteiro WM, Reis D, Bossolani GDP, Gomes ML, de Araújo SM, et al. In vivo susceptibility to benznidazole of *Trypanosoma cruzi* strains from the western Brazilian Amazon. *Trop Med Int Health.* 2013;18:85–95.
41. The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2018;45:2699.
42. Finn RD, Tate J, Mistry J, Coghill PC, Sammut SJ, Hotz HR, et al. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 2008;36:281–8.
43. Wei Z, Zhang S. NPBSS: a new PacBio sequencing simulator for generating the continuous long reads with an empirical model. *BMC Bioinformatics.* 2018;19:177.
44. Liu L, Hu N, Wang B, Chen M, Wang J, Tian Z, et al. A brief utilization report on the Illumina HiSeq 2000 sequencer. *Mycology.* 2011;2:169–91.
45. Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *arXiv.* 2013;00:1–3.
46. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25:2078–9.
47. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977;74:5463–7.
48. Machado M, Magalhães WCS, Sene A, Araújo B, Faria-Campos AC, Chanock SJ, et al. Phred-Phrap package to analyses tools: a pipeline to facilitate population genetics re-sequencing studies. *Investig Genet.* 2011;2:3.
49. Amid C, Alako BTF, Kadhirvelu VB, Burdett T, Burgin J, Fan J, et al. The European nucleotide archive. *Nucleic Acids Res.* 2020;48:70–6.
50. O’Leary NA, Wright MW, Brister JR, Ciufu S, Haddad D, McVeigh R, et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:733–45.
51. Edgar RC. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics.* 2004;5:113.
52. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 2018;35:1547–9.
53. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and high-performance computing. *Nat Methods.* 2012;9:772.
54. Guindon S, Dufayard J, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol.* 2010;59:307–21.
55. Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol.* 2012;61:539–42.
56. FigTree. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Accessed 20 Feb 2020.
57. Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 2018;46:1074–82.
58. Romanha AJ, Castro SL, Soeiro MNC, Lannes-Vieira J, Ribeiro I, Talvani A, et al. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010;105:233–8.
59. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran A, et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science.* 2005;309:409.
60. Berná L, Rodríguez M, Chiribao ML, Parodi-Tallice A, Pita S, Rijo G, et al. Expanding an expanded genome: long-read sequencing of *Trypanosoma cruzi*. *Microb Genom.* 2018;4:e000177.
61. Thomsen M, Vitetta L. Zinc deficits, mucositis, and mucosal macrophage perturbation: is there a relationship? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2019;22:365–70.
62. Liu Z, Xie W, Li M, Liu J, Liang X, Li T. Intrarectally administered polaprezinc attenuates the development of dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis in mice. *Exp Ther Med.* 2019;18:4927–34.
63. Ye J, Zhang Z, Zhu L, Lu M, Li Y, Zhou J, et al. Polaprezinc inhibits liver fibrosis and proliferation in hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep.* 2017;16:5523–8.
64. Fujii H, Hirose C, Ishihara M, Iihara H, Imai H, Tanaka Y, et al. Improvement of dysgeusia by polaprezinc, a zinc-L-carnosine, in outpatients receiving cancer chemotherapy. *Anticancer Res.* 2018;38:6367–73.
65. Yoshikawa F, Nakajima T, Hanada M, Hirata K, Masuyama T, Aikawa R. Beneficial effect of polaprezinc on cardiac function post-myocardial infarction: a prospective and randomized clinical trial. *Medicine (Baltimore).* 2019;98:e14637.
66. Kimura K, Nakano Y, Sugizaki T, Shimoda M, Kobayashi N, Kawahara M, et al. Protective effect of polaprezinc on cadmium-induced injury of lung epithelium. *Metallomics.* 2019;11:1310–20.
67. Karlsson JOG, Andersson RGG, Jynge P. Mangafodipir a selective cyto-protectant—with special reference to oxaliplatin and its association to chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN). *Transl Oncol.* 2017;10:641–9.
68. Piacenza L, Peluffo G, Alvarez MN, Martínez A, Radi R. *Trypanosoma cruzi* antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas disease. *Antioxid Redox Signal.* 2013;19:723.
69. Martínez A, Prolo C, Estrada D, Rios N, Alvarez MN, Piñeyro MD, et al. Cytosolic Fe-superoxide dismutase safeguards *Trypanosoma cruzi* from macrophage-derived superoxide radical. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019;116:8879–88.
70. Lewis MD, Llewellyn MS, Yeo M, Acosta N, Gaunt MW, Miles MA. Recent, independent and anthropogenic origins of *Trypanosoma cruzi* hybrids. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5:1363.
71. Monteiro WM, Teston APM, Gruendling AP, dos Reis D, Gomes ML, de Araújo SM, et al. *Trypanosoma cruzi* I and IV stocks from Brazilian Amazon are divergent in terms of biological and medical properties in mice. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7:2069.
72. Sánchez-Moreno M, Sanz AM, Gómez-Contreras F, Navarro P, Marín C, Ramírez-Macias I, et al. In vivo trypanosomicidal activity of imidazole- or pyrazole-based benzol[g]phthalazine derivatives against acute and chronic phases of Chagas disease. *J Med Chem.* 2011;54:970–9.
73. Sánchez-Moreno M, Gómez-Contreras F, Navarro P, Marín C, Olmo F, Yunta MJR, et al. Phthalazine derivatives containing imidazole rings behave as Fe-SOD inhibitors and show remarkable anti-*T. cruzi* activity in immunodeficient-mouse mode of infection. *J Med Chem.* 2012;55:9900–13.
74. Toledo MJO, Bahia MT, Cláudia MC, Martins-Filho OA, Tibayrenc M, Barnabé C, et al. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:223–30.
75. Phan IQH, Davies DR, Moretti NS, Shanmugam D, Cestari I, Anupama A, et al. Iron superoxide dismutases in eukaryotic pathogens: new insights from apicomplexa and *Trypanosoma* structures. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* 2015;71:615–21.
76. Bachega JFR, Navarro MVAS, Bleicher L, Bortoleto-Bugs RK, Dive D, Hoffmann P, et al. Systematic structural studies of iron superoxide dismutases from human parasites and a statistical coupling analysis of metal binding specificity. *Proteins.* 2009;77:26–37.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Perspectives From Systems Biology to Improve Knowledge of *Leishmania* Drug Resistance

Elvira Cynthia Alves Horácio^{1,2}, Jéssica Hickson¹, Silvane Maria Fonseca Murta¹, Jeronimo Conceição Ruiz¹ and Laila Alves Nahum^{1,2,3*}

¹ René Rachou Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Belo Horizonte, Brazil, ² Department of Genetics, Ecology and Evolution, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ³ Promove College of Technology, Belo Horizonte, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Luiz Gustavo Gardinassi,
Universidade Federal de Goiás, Brazil

Reviewed by:

Denis Sereno,
Institut de Recherche Pour le
Développement
(IRD), France

Adriano Cappellazzo Coelho,
State University of Campinas, Brazil

*Correspondence:

Laila Alves Nahum
laila@nahum.com.br

Specialty section:

This article was submitted to
Parasite and Host,
a section of the journal
Frontiers in Cellular
and Infection Microbiology

Received: 14 January 2021

Accepted: 09 April 2021

Published: 30 April 2021

Citation:

Horácio ECA, Hickson J, Murta SMF,
Ruiz JC and Nahum LA (2021)
Perspectives From Systems
Biology to Improve Knowledge
of *Leishmania* Drug Resistance.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 11:653670.
doi: 10.3389/fcimb.2021.653670

Neglected Tropical Diseases include a broad range of pathogens, hosts, and vectors, which represent evolving complex systems. Leishmaniasis, caused by different *Leishmania* species and transmitted to humans by sandflies, are among such diseases. *Leishmania* and other Trypanosomatidae display some peculiar features, which make them a complex system to study. Leishmaniasis chemotherapy is limited due to high toxicity of available drugs, long-term treatment protocols, and occurrence of drug resistant parasite strains. Systems biology studies the interactions and behavior of complex biological processes and may improve knowledge of *Leishmania* drug resistance. System-level studies to understand *Leishmania* biology have been challenging mainly because of its unusual molecular features. Networks integrating the biochemical and biological pathways involved in drug resistance have been reported in literature. Antioxidant defense enzymes have been identified as potential drug targets against leishmaniasis. These and other biomarkers might be studied from the perspective of systems biology and systems parasitology opening new frontiers for drug development and treatment of leishmaniasis and other diseases. Our main goals include: 1) Summarize current advances in *Leishmania* research focused on chemotherapy and drug resistance. 2) Share our viewpoint on the application of systems biology to *Leishmania* studies. 3) Provide insights and directions for future investigation.

Keywords: *Leishmania*, chemotherapy, drug resistance, systems biology, systems parasitology, molecular networks

INTRODUCTION

Leishmania is a complex biological system in itself. In the lack of an effective vaccine, human treatment relies on chemotherapy since the early 1920's. Drug resistance of parasite strains adds a layer of complexity to this public health issue. Systems biology, which access interactions and behavior of complex biological processes, may improve knowledge of *Leishmania* drug resistance. **Figure 1** shows the major components of *Leishmania* systems biology discussed in the present work.