

RESUMO

MORAES, Julio Cesar. **Desenvolvimento de bibliotecas de *phage display* para a obtenção de marcadores e/ou inibidores biológicos contra *Trypanosoma evansi***. 2017. 115 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2017.

Trypanosoma evansi é um hemoprotozoário parasito, causador da doença conhecida como “Surra” ou “Mal das Cadeiras”, tendo sido descrito em várias espécies, como cães, capivaras, quatis, bovinos, búfalos, sendo os equinos a espécie mais acometida. É responsável por prejuízos diretos no setor de equinocultura e, indiretos no setor pecuário que utilizam essa espécie no manejo de outros animais de produção. O *T. evansi* é transmitido de maneira acíclica por insetos (Tabanidae e Stomoxyidae) e morcegos hematófagos e, de maneira iatrogênica (vacinações e coleta de sangue). Com o objetivo de identificar novos alvos para o controle e ou diagnóstico do *T. evansi*, utilizamos a tecnologia de *phage display* associada à técnica *Kunkel* de mutagênese direcionada para construir uma biblioteca de proteínas com diversidade superior a um milhão de proteínas distintas e mesmo após a diversificação, a biblioteca manteve como base estrutural o esqueleto protéico de uma toxina atenuada com Domínio *Kunitz* presente no veneno do escorpião *Mesobuthus tamulus*. As mutações foram direcionadas, com auxílio da estrutura cristalográfica da toxina, para resíduos específicos na porção C-terminal da α -hélice e no *loop* menor da proteína. O DNA mutante foi purificado e amplificado pela técnica de Círculo Rolante Seletivo. Clones da biblioteca foram sequenciados, onde foi evidenciado uma taxa próxima de 100% de inserções de mutações resíduo específicas. Em seguida a biblioteca foi utilizada em seleções de afinidade contra o *T. evansi* para busca de ligantes específicos ao parasito. Após um *round in vivo* e dois *in vitro*, seis clones foram selecionados para estudos individuais de potência, especificidade de ligação e toxicidade. Entre todos os clones, em especial, os clones 5 e 1 apresentaram um maior potencial de ligação ao *T. evansi* e ausência de ligação contra outros tripanosomatídeos (*T. cruzi* e *T. rangeli*). Os clones 1, 2 e 5 demonstraram ser tóxicos para o *T. evansi* causando uma mortalidade de 13%, 31,5% e 19,7%, respectivamente. O DNA dos clones 1, 2 e 5 foram sequenciados, demonstrando que houve a inserção de mutações. A biblioteca derivada de toxinas, bem como os clones 1 e 5 identificados demonstraram possuir potencial para o desenvolvimento de novos testes para o diagnóstico direto de *T. evansi*. Os clones 1, 2 e 5 que demonstraram atividade tóxica, poderão servir como base para outros estudos, visando o desenvolvimento de novas drogas com atividade tripanocida.

Palavras-chave: *Trypanosoma evansi*. *Phage display*. *Kunitz*. Diagnóstico. Tripanocida.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
1.1	<i>Trypanosoma evansi</i>	24
1.1.1	Aspectos gerais.....	24
1.1.2	Infecção de humanos pelo <i>Trypanosoma evansi</i>.....	26
1.1.3	Transmissão do <i>Trypanosoma evansi</i>.....	27
1.1.3.1	<i>Ciclo biológico T. evansi</i>.....	28
1.1.4	Imunidade contra o <i>Trypanosoma evansi</i>	29
1.1.5	Distribuição e epidemiologia	29
1.1.6	Diagnóstico	31
1.1.7	Drogas Tripanocidas e a resistência à terapêutica	33
1.1.8	<i>Phage display</i>	36
1.1.9	Proteína de Domínio <i>Kunitz</i>.....	40
2	JUSTIFICATIVA.....	45
3	HIPÓTESE.....	46
4	OBJETIVOS	47
4.1	OBJETIVO GERAL.....	47
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	48
5.1	CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE <i>PHAGE DISPLAY</i> COM A PROTEÍNA DE DOMÍNIO <i>KUNITZ</i>.....	48

5.1.1	Construção da biblioteca de <i>phage display</i> utilizando como esqueleto a proteína de Domínio <i>Kunitz</i> BTK-2	49
5.1.2	Reação de sobreposição dos oligonucleotídeos para a construção do gene da BTK-2mut.....	52
5.1.3	Clonagem do gene BTK-2mut no pGEM-T Easy® e transformação em DH10B	53
5.1.4	Reação de digestão do clone 8 e do fagomídeo PJH3 WT D5 (vetor pAPIII6)	54
5.1.5	Reação de ligação do gene da BTK-2mut no fagomídeo pAPIII6.....	55
5.1.6	Transformação da ligação em <i>E. coli</i> linhagem XL1B eletrocompetente .	55
5.1.6.1	<i>Produção de E. coli linhagem XL1B eletrocompetente</i>	57
5.1.6.2	<i>Teste de competência da E. coli linhagem XL1B</i>	58
5.1.7	Montagem do fago a partir do fagomídeo pAPIIIK2 (gene da BTK-2mut com o vetor pAPIII6)	58
5.1.7.1	<i>Produção do helper phage (M13KO7).....</i>	59
5.1.7.1.1	<i>Titulação do helper phage (M13KO7)</i>	60
5.1.7.2	<i>SDS-PAGE do fago contendo o gene da BTK-2mut.....</i>	60
5.1.7.3	<i>Western Blotting do fago contendo o gene da BTK-2mut</i>	61
5.1.8	Kunkel Mutagênese.....	62
5.1.8.1	<i>Produção de DNA simples fita uracilado – ss(U)DNA.....</i>	62
5.1.8.2	<i>Mutação sítio dirigida</i>	63
5.1.8.3	<i>Amplificação por Círculo Rolante Seletivo do produto da Kunkel Mutagênese</i>	64
5.1.8.4	<i>Produção de E. coli linhagem XL1B eletrocompetente com helper phage.....</i>	65
5.1.8.5	<i>Transformação da biblioteca em Escherichia coli XL1Blue eletrocompetente</i>	67

5.1.9	Infecção de <i>Balb/c</i> com <i>T. evansi</i> para o <i>Panning in vivo</i>.....	68
5.1.10	Seleção <i>in vivo</i> contra <i>T. evansi</i>	68
5.1.10.1	<i>Titulação dos fagos obtidos no round out in vivo</i>	71
5.1.10.2	<i>Amplificação do round out em <i>E. coli</i> XL1Blue</i>	72
5.1.11	Seleção <i>in vitro</i> contra <i>T. evansi</i> round dois e três	73
5.1.12	Estudo da eficiência de ligação contra <i>T. evansi</i> dos clones obtidos a partir do terceiro round out	75
5.1.13	Estudo da eficiência de ligação contra <i>T. cruzi</i> e <i>T. rangeli</i> dos clones selecionados a partir do terceiro round out.....	76
5.1.14	Estudo da eficiência de ligação e do efeito tripanocida contra <i>T. evansi</i> dos clones obtidos a partir do terceiro round out, utilizando citometria de fluxo	76
5.1.14.1	<i>Estudo da eficiência de ligação dos seis clones marcados com FITC, e analisados por meio da citometria de fluxo</i>	76
5.1.14.2	<i>Estudo da toxicidade de cinco clones contra <i>T. evansi</i>, marcados com iodeto de propídio, e analisados por meio da citometria de fluxo.....</i>	78
6	RESULTADOS.....	80
6.1	CONFIRMAÇÃO DA CONSTRUÇÃO DA PROTEÍNA DE DOMÍNIO <i>KUNITZ BTK-2MUT</i>	80
6.2	CLONAGEM DO GENE DA PROTEÍNA DE DOMÍNIO <i>KUNITZ BTK-2MUT</i> NO PGEM-T EASY®	81
6.2.1	PCR com várias combinações de primers para a confirmação da proteína de Domínio <i>Kunitz BTK-2mut</i> no clone 8 (vetor pGEM-T Easy®)	81
6.3	CLONAGEM DA PROTEÍNA DE DOMÍNIO <i>KUNITZ</i> NO FAGOMÍDEO PAPIII6 E MONTAGEM DOS FAGOS.....	82

6.3.1	Digestão do DNA do clone 8 para a recuperação do gene da proteína de domínio <i>Kunitz BTK-2mut</i>	82
6.3.2	Digestão do fagomídeo PJH3 WT D5 para a recuperação do vetor pAPIII6	83
6.3.3	Avaliação da competência da <i>E. coli</i> linhagem XL1B eletrocompetente	84
6.3.4	Confirmação da clonagem do gene da <i>BTK-2mut</i> no pAPIII6	85
6.3.4.1	Reação da PCR para triagem de colônias positivas para o gene <i>BTK-2mut</i> ..	85
6.3.4.2	Sequenciamento do clone 2 – <i>BTK-2mut</i> . ligada ao vetor pAPIII6	85
6.3.5	Titulação do helper phage (M13KO7).....	86
6.3.6	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em solução desnaturante de Dodecil Sulfato de Sódio e Western Blotting do fago produzido com o fagomídeo pAPIIIK2 para a verificação da expressão da proteína de Domínio Kunitz <i>BTK-2mut</i>	87
6.4	KUNKEL MUTAGÊNESE OU MUTAÇÃO SÍTIO DIRIGIDA	88
6.4.1	Transformação da biblioteca pAPIIIK2-4 em <i>E. coli</i> XL1B eletrocompetentes	88
6.4.2	Sequenciamento de clones da biblioteca pAPIIIK2-4 para a verificação da inserção de mutações.....	90
6.5	ROUNDS PARA SELEÇÃO <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i> CONTRA <i>T. evansi</i>	91
6.5.1	Titulação dos fagos recuperados após seleção <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> contra <i>T. evansi</i>	91
6.5.2	Titulação dos fagos clones recuperados após o estudo de ligação ao <i>T. evansi</i>	92
6.5.3	Titulação dos fagos clones recuperados após o estudo de ligação ao <i>T. cruzi</i> e <i>T. rangeli</i>	93

6.5.4	Testes qualitativos de eficiência de ligação e do efeito tripanocida contra <i>T. evansi</i> dos seis clones, resultados obtidos por meio de citometria de fluxo	94
6.5.4.1	<i>Eficiência de ligação dos seis clones contra <i>T. evansi</i>, marcados com FITC, e analisados por meio de citometria de fluxo</i>	94
6.5.4.2	<i>Toxicidade de cinco clones contra <i>T. evansi</i>, marcados com iodeto de propídio, e analisado por meio de citometria de fluxo</i>	95
7	DISCUSSÃO	99
8	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	107
9	REFERÊNCIAS	108

9 REFERÊNCIAS

ANENE, B. M. et al. Trypanocidal resistance in *Trypanosoma evansi* in vitro: effects of Verapamil, Cyproheptidine, Desipramine and Chlorpromazine alone and in combination with trypanocides. **Veterinary Parasitology**. v. 62, p. 43-50, 1996.

ATTUCCI, S. et al. EPI-hNE4, a Proteolysis-Resistant Inhibitor of Humane Neutrophil Elastase and Potential Anti-Inflammatory Drug for Treating Cystic Fibrosis. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**. v. 318, n. 2, p. 803–809, 2006.

AUTY, H. et al., Cattle trypanosomosis: the diversity of trypanosomes and implications for disease epidemiology and control. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.** v. 34, n. 2, p. 587–598, 2015.

BARAL, T. N. et al. Experimental therapy of African trypanosomiasis with a nanobody-conjugated human trypanolytic factor. **Nature Medicine**. v. 12, n. 5, p. 580–584, 2006.

BARAL, T. N. et al. Control of *Trypanosoma evansi* infection is IgM mediated and does not require a type I inflammatory response. **The Journal of Infectious Diseases** v. 195, p.1513–1520, 2007.

BARBAS III, C. F et al. Selection from Antibody libraries. **In: Phage Display – A Laboratory Manual – USA: Cold Spring Laboratory**. 2001, p. 10.2-10.4.

BERLIN D. et al. Disseminated central nervous system disease caused by *Trypanosome evansi* in a horse. **Veterinary Parasitology**. v. 161, p. 316–319, 2009.

BINZ, H. K. et al. Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. **Nature Biotechnology**. v. 23, n. 10, 2005.

BORJIGIN, J; NATHANS, J. Bovine pancreatic trypsin inhibitor-trypsin complex as a detection system for recombinant proteins. **Biochemistry**. v. 90, p. 337-341, 1993.

BREINL, A.; TODD, J. L. Atoxyl in the treatment of trypanosomiasis. **The Britihs Medical Journal**. p 132-134, 1907.

BREITLING, F. et al. Improving Phage Display Throughput by Using Hyperphage, Miniaturized Titration and pVIII (g8p) ELISA. In: KONTERMANN R.; DÜBEL S., **Antibody Engineering**. Berlin: Springer, 2010. p. 197-206.

BÜSCHER, P. et al. Diagnosis of African Trypanosomiasis. In: Magez, S and Radwanska C. B. **Trypanosomes and Trypanosomiasis**. Springer; 2014. p. 294.

CAMARGO, R. E. et al. Isolation of two antigens from *Trypanosoma evansi* that are partially responsible for its cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*. **Veterinary Parasitology**. v. 123, p. 67–81, 2004.

- CAMARGO, R. E. et al. Variant surface glycoproteins from Venezuelan trypanosome isolates are recognized by sera from animals infected with either *Trypanosoma evansi* or *Trypanosoma vivax*. **Veterinary Parasitology**. v. 207, p. 17–33, 2015.
- CARNES, J. et al. Genome and Phylogenetic Analyses of *Trypanosoma evansi* Reveal Extensive Similarity to *T. brucei* and Multiple Independent Origins for Dyskinetoplasty. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 9, n. 1, p. 1–21, 2015.
- Chau, N. V. V. et al. A Clinical and Epidemiological Investigation of the First Reported Human Infection With the Zoonotic Parasite *Trypanosoma evansi* in Southeast Asia. **Clinical Infectious Diseases**. v. 62, n. 8, p. 1002–1008, 2016.
- CLAES, F. et al. Variable Surface Glycoprotein RoTat 1.2 PCR as a specific diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma evansi* infections. **Kinetoplastid Biology and Disease**., v. 3, n.3, p. 1-6, 2004.
- CLARK, M. A. Standard Protocols for the Construction of Fab Libraries. In O'BRIEN, P. M.; AITKEN, R. **Methods in Molecular Biology, v. 178: Antibody Phage Display: Methods and Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2002. p. 39-58.
- COSTA, A. D. T.; KRIEGER, M. A. Evidence for an ATP-sensitive K⁺ channel in mitoplasts isolated from *Trypanosoma cruzi* and *Crithidia fasciculata*. **International Journal for Parasitology**. v. 39, p. 955-961, 2009.
- COSTA, L. E. et al. Subtractive Phage Display Selection from Canine Visceral Leishmaniasis Identifies Novel Epitopes That Mimic *Leishmania infantum* Antigens with Potential Serodiagnosis Applications. **Clinical and Vaccine Immunology**. v. 21, p. 96-106, 2014.
- COSTA, L. E. et al. Antigenicity of phage clones and their synthetic peptides for the serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 14-22, 2017.
- DA SILVA, A. S. et al. Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em bovinos de uma propriedade leiteira no município de Videira - SC, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 35, n. 3, p. 373-376, 2007.
- DA SILVA, A. S. et al. Aceturato de diminazeno no tratamento de equinos infectados naturalmente por *Trypanosoma evansi* no município de Cruz Alta-RS, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**. v. 16, n. 1 p. 74–79, 2009.
- DA SILVA, G. F. et al. Chain Residues to High Affinity Binding in an HIV-1 Antibody Explored by Combinatorial Scanning Mutagenesis. **Biochemistry**. v. 49, n. 26, p. 5464–5472, 2010.
- DA SILVA, J. A. et al, Reemerging of natural infection by *Trypanosoma evansi* in horses in Arari, Marajó Island, Brazil. **Ciência Rural**. v.46, n.12, p.2170-2176, 2016.

- DENNIS, M. S.; LAZARUS, R. A. Kunitz Domain Inhibitors of Tissue Factor-Factor VIIa I. Potent Inhibitors Selected From Libraries By Phage Display. **The journal biological chemistry**. v. 269, n. 35, p. 22129-22136, 1994.
- DESQUESNES, M; DÁVILA, A. M. R. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. **Veterinary Parasitology**. v. 109, p. 213–231, 2002.
- DESQUESNES, M. **Livestock Trypanosomoses and their Vectors in Latin America**. World organisation for animal health. 174pp, 2004.
- DESQUESNES, M. et al. *Trypanosoma evansi* and Surra: A Review and Perspectives on Transmission, Epidemiology and Control, Impact, and Zoonotic Aspects. **BioMed Research International**. p. 01-20, 2013a.
- DESQUESNES, M. et al. *Trypanosoma evansi* and Surra: A Review and Perspectives on Origin, History, Distribution, Taxonomy, Morphology, Hosts, and Pathogenic Effects. **BioMed Research International**. p. 1-22, 2013b.
- DEVY, L. et al. PEGylated DX-1000: Pharmacokinetics and Antineoplastic Activity of a Specific Plasmin Inhibitor. **Neoplasia**. v. 9, n. 11, p. 927–937, 2007.
- DHAWAN, R. et al. BTK-2, a new inhibitor of the Kv1.1 potassium channel purified from Indian scorpion *Buthus tumulus*. **FEBS Letters**. v. 539, p. 7-13, 2003.
- DIAS, A. M. G. C.; Roque, A. C. A. The Future of Protein Scaffolds as Affinity Reagents for Purification. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 114, n. 3, p. 488–499, 2017.
- EL RAYAH, I. E. et al. Drug resistance in Sudanese *Trypanosoma evansi*. **Veterinary Parasitology**. v. 80, p. 281-287, 1999.
- FACCIO, L. et al. Susceptibility of Brazilian isolates of *Trypanosoma evansi* to suramin sodium: Test in experimentally infected mice. **Experimental Parasitology**. v. 13, p. 309–312, 2013.
- FAIX, P. H. et al. Phage display of cDNA libraries: enrichment of cDNA expression using open reading frame selection. **BioTechniques**. v. 36, p. 1018-1029, 2004.
- FORTES, E. Protozoologia. In: _____. **Parasitologia veterinária**. 4. ed. rev. aum. São Paulo: Ícone, 2004. cap. 2.
- FRANKE, C. R. et al. Investigations on naturally occurring *Trypanosoma evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Pantanal de Poconé (Mato Grosso, Brazil). **Acta Tropica**. v 58, p.159-169, 1994.
- GAO, J. et al. Phage display and its application in vaccine design. **Annals of Microbiology**. v. 60, p. 13-19, 2010.

- GARDINER, C.H. et al. **An Atlas of Protozoan Parasites in Animal Tissues.** Agriculture Handbook 651. Unites States Department of Agriculture, Washington, DC, p. 3, 1988.
- GARI, F. R. et al. Comparative diagnosis of parasitological, serological, and molecular tests in dourine-suspected horses. **Trop. Anim. Health Prod.** v. 42, p. 1649–1654, 2010.
- GIBSON, W. Resolution of the species problem in African trypanosomes. **International Journal for Parasitology.** v. 37, p. 829-838, 2007.
- GIORDANI, F. et al. The animal trypanosomiases and their chemotherapy: a review. **Parasitology.** v 143, n. 14, p. 1862-1889, 2016.
- GIORDANO, R. J. et al. Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. **Nature medicine.** v. 7, n. 11, p. 1249–1253, 2001.
- GRAB, D.J; BWAYO, J.J. Isopycnic isolation of African trypanosomes on Percoll gradients formed in situ. **Acta Trop.** v.39, n.4, p. 363-366, 1982.
- HERRERA H. M. et al. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology.** v. 125, p. 263-275, 2004.
- HOSSE, R. J. et al. A new generation of protein display scaffolds for molecular recognition. **Protein Science.** v. 15, p. 14–27, 2006.
- HUANG, C. et al. Scorpion-Toxin Mimics of CD4 in Complex with Human Immunodeficiency Virus gp120: Crystal Structures, Molecular Mimicry, and Neutralization Breadth. **Structure.** v. 13, p.755–768, 2005.
- HUANG, J. X. et al. Development of Anti-Infectives Using Phage Display: Biological Agents against Bacteria, Viruses, and Parasites. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v. 56, n. 9, p. 4569–4582, 2012.
- HUOVINEN, T. et al. Primer Extension Mutagenesis Powered by Selective Rolling Circle Amplification. **Plos one,** v. 7, n. 2, p. 1–9, 2012.
- JOSHI, P. P. et al. Human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India: The first case report. **Am. J. Tropical Medicine and Hygiene.** v. 73, n. 3, p. 491–495, 2005.
- KUMAR, G. S. et al., Solution structure of BTK-2, a novel hKv1.1 inhibiting scorpion toxin, from the eastern Indian scorpion *Mesobuthus tamulus*. **Biochimica et Biophysica Acta,** v. 1814, p. 459–469, 2011.
- LAI, D. et al. Adaptations of *Trypanosoma brucei* to gradual loss of kinetoplast DNA: *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi* are petite mutants of *T. brucei*. **PNAS.** v. 105, n. 6, p. 1999–2004, 2008.

- LAROCCA, D. et al. Receptor-Targeted Gene Delivery Using Multivalent Phagemid Particles. **Molecular Therapy**. v. 3, n. 4, p. 476-484, 2001.
- LI, S. et al., Immunization with recombinant beta-tubulin from *Trypanosoma evansi* induced protection against *T. evansi*, *T. equiperdum* and *T. b. brucei* infection in mice. **Parasite Immunology**. v. 29, p. 191–199, 2007.
- LIVINGSTONE, D. Arsenic as a Remedy for the Tsetse Bite. **British Medical Journal**. v. 1, n. 70, p. 360–361, 1858.
- LUBEGA, G. H. et al. *Trypanosoma brucei*: anti-tubulin antibodies specifically inhibit trypanosome growth in culture. **Experimental Parasitology**. v. 102, p. 134–142, 2002.
- MAGDESIAN, M, H. Phage Display. In: ULRICH, A. H. et al. **Bases moleculares da biotecnologia**. São Paulo: ROCCA. p 91-108, 2008.
- MARTINS, L. et al. Rational design of a CD4 mimic that inhibits HIV-1 entry and exposes cryptic neutralization epitopes. **Nature biotechnology**. v. 21, p 71-76, 2003.
- MORENO A. S. et al. Importance of the horse and financial impact of equine trypanosomiasis on cattle raising in Venezuela. **Trop. Anim. Health Prod.** v. 45, p. 1669–1676, 2013.
- MOSIMANN, M. et al. A Trk/HKT-Type K⁺ Transporter from *Trypanosoma brucei*. **Eukaryotic Cell**. v. 9, n. 4, p. 539–546, 2010.
- NGAIRA, J. M. et al. The detection of non-RoTat 1.2 *Trypanosoma evansi*. **Experimental Parasitology**. v. 110, p. 30 – 38, 2005.
- NIKOUÉE, A. et al. Charybdotoxin and Margatoxin Acting on the Human Voltage-Gated Potassium Channel hKv1.3 and Its H399N Mutant: An Experimental and Computational Comparison. **J. Phys. Chem. B**. v. 116, p. 5132–5140, 2012.
- NUNES, J. T. S. et al. Occurrence of *Trypanosoma evansi* in Horses in the State of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 32, p. 205-207, 2012.
- PANDE, J. et al. Phage display: Concept, innovations, applications and future. **Biotechnology Advances**. v. 28, p. 849-858, 2010.
- OBISHAKIN et al., Generation of a Nanobody Targeting the Paraflagellar Rod Protein of Trypanosomes. **PLOS ONE**, p. 1-17, 2014.
- ODONGO, S. et al. An Anti-proteome Nanobody Library Approach Yields a Specific Immunoassay for *Trypanosoma congolense* Diagnosis Targeting Glycosomal Aldolase. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v 10, n. 2, p. 1-24, 2016.
- PARREIRA, D. R. et al. Health and epidemiological approaches of *Trypanosoma evansi* and equine infectious anemia virus in naturally infected horses at southern Pantanal. **Acta Trop.** v. 163, p. 98-102, 2016.

- ROBERTS, B. L. et al. Directed evolution of a protein: Selection of potent neutrophil elastase inhibitors displayed on M13 fusion phage. **Biochemistry**. v. 89, p. 2429–2433, 1992.
- RODRIGUES, A. et al. Surtos de tripanossomíase por *Trypanosoma evansi* em equinos no Rio Grande do Sul: aspectos epidemiológicos, clínicos, hematológicos e patológicos. **Pesq. Vet. Bras.** v. 25, n. 4, p. 239-249, 2005.
- RODRIGUES, A. et al. Neuropathology of Naturally Occurring *Trypanosoma evansi* Infection of Horses. **Vet. Pathol.** v. 46, p. 251–258, 2009.
- RONDOT, S. et al. A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. **Nature Biotechnology**. v. 19, p. 75-78, 2001.
- SÁNCHEZ, E. et al. Kinetoplast ultrastructure of five *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma equiperdum* venezuelan isolates. **Acta Microscopica**. v. 25, n. 4, p.150–157, 2016.
- SANG, Y; BLECHA, F. Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. **Animal Health Research Reviews**. v. 9, n. 2, p. 227–235, 2008.
- SEIDL, A. et al. A financial analysis of treatment strategies for *Trypanosoma evansi* in the Brazilian Pantanal. **Prev Vet Med**, v. 33, p. 219-234, 1998.
- SEIDL A. F. et al. *Trypanosoma evansi* Control and Horse Mortality in the Brazilian Pantanal. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 96, n. 5, p. 599-602, 2001.
- SILVA, R. A. M. S. et al. Outbreak of trypanosomosis due to *Trypanosoma evansi* in horses of Pantanal Mato-grossense, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 60, p 167-171, 1995.
- SINGLA, L. D. et al. Comparative evaluation of agglutination assay with microscopy and polymerase chain reaction for detection of *Trypanosoma evansi* in bovines of Punjab. **Indian Journal of Animal Sciences**. v. 85, n. 11, p. 1164–1166, 2015.
- SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. v. 228, n. 4705, p. 1315–1317, 1985.
- SMITH, G. P; PETRENKO, V.A. Phage Display. **Chemical Review**, v. 97, p. 391-410, 1997.
- STOCO, P.H. et al. Other Major Trypanosomiasis. In: Marcondes CB, editor. **Arthropod borne diseases**. Cham (Switzerland): Springer International Publishing; 2017. p. 562.
- STIJLEMANS, B. et al. Efficient Targeting of Conserved Cryptic Epitopes of Infectious Agents by Single Domain Antibodies. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 279, n. 2, p. 1256–1261, 2004.

- STIJLEMANS, B. et al. High Affinity Nanobodies against the Trypanosome brucei VSG Are Potent Trypanolytic Agents that Block Endocytosis. **PLoS Pathog.** v. 7, n. 6, p. 1-15, 2011.
- SUSWAM, E. A. et al. Changes in properties of adenosine transporters in *Trypanosoma evansi* and modes of selection of resistance to the melaminophenyl arsenical drug, Mel Cy. **Veterinary Parasitology.** v.102, p. 193–208, 2001.
- TEHSEEN, S. et al. Parasitological, serological and molecular survey of *Trypanosoma evansi* infection in dromedary camels from Cholistan Desert, Pakistan. **Parasites & Vectors.** v. 8, p. 415–426, 2015.
- TEHSEEN, S. et al. Field investigation of *Trypanosoma evansi* and comparative analysis of diagnostic tests in horses from Bahawalpur, Pakistan. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences.** v. 41, p. 288-293, 2017.
- TEJERO, F. et al. *Trypanosoma evansi*: A quantitative approach to the understanding of the morphometry-hematology relationship throughout experimental murine infections. **J. Protozool. Res.** v. 18, p. 34-47, 2008.
- THOMSON, R.; FINKELSTEIN, A. Human trypanolytic factor APOL1 forms pH-gated cation-selective channels in planar lipid bilayers: Relevance to trypanosome lysis. **PNAS,** v.112, n. 9, p. 2894–2899, 2015.
- TONIKIAN, R. et al. Identifying specificity profiles for peptide recognition modules from phage-displayed peptide libraries. **Nature protocols.** v.2, n. 6, p. 1368 – 1386, 2007.
- UILENBERG, G. **A field guide for the diagnosis, treatment and prevention of African animal trypanosomosis.** Food and Agriculture Organization of United Nations, Italy.158pp, 1998.
- URAKAWA, T. et al. *Trypanosoma evansi*: Cloning and Expression in *Spodoptera fugiperda* Insect Cells of the Diagnostic Antigen RoTat1.2. **Experimental Parasitology.** v. 99, p. 181–189, 2001.
- UZCANGA, G. et al. Purification of a 64 kDa antigen from *Trypanosoma evansi* that exhibits cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*. **Parasitology.** v. 124, p. 287-299. 2002.
- VANHOLLEBEKE, B. et al. Human *Trypanosoma evansi* Infection Linked to a Lack of Apolipoprotein L-I. **The new england journal of medicine.** v. 355; n. 26, p .2752–2756, 2006.
- VAN NIEUWENHOVE, L. C. et al. Identification of Peptide Mimotopes of *Trypanosoma brucei gambiense* Variant Surface Glycoproteins. **PLoS Negl Trop. Dis.** v. 5, n. 6, p. 1–9 , 2011.

VELÁSQUEZ, N. P. et al. Partial Purification of Integral Membrane Antigenic Proteins from *Trypanosoma evansi* That Display Immunological Cross-Reactivity with *Trypanosoma vivax*. **Journal of Parasitology Research**. p. 1–11, 2014.

VITA, C. et al. Scorpion toxins as natural scaffolds for protein engineering. **Biochemistry**. v. 92, p. 6404-6408, 1995.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. OIE Terrestrial Manual: *Trypanosoma evansi* Infection (Surra). 2012. 15 p. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2008/pdf/2.01.17_TRY_PANO_SURRA.pdf. Acesso em: 01 jun. 2017.

WILLIAMSON, J.; LOURIE, E. M. Melarsen and Melarsen Oxide. **Journal article: Nature**. v. 14, p.103-104, 1948.

WILLIAMSON, J; ROLLO, I. M. Drug resistance in trypanosomes; crossresistance analyses. **Brit. J. Pharmacol**. v. 14, p. 423-430, 1959.

WILLIAMS, A.; Baird, L. G. DX-88 and HAE: a developmental perspective. Transfusion and Apheresis. **Science**. v. 29, p. 255–258, 2003.

XONG, H. V. et al. A VSG Expression Site–Associated Gene Confers Resistance to Human Serum in *Trypanosoma rhodesiense*. **Cell**. v. 95, p. 839–846, 1998.

ZHAO, A. et al. A conformation-constrained peptide library based. **Peptides**. v. 25, p. 629–635, 2004.

ZHAO, L. Verapamil inhibits tumor progression of chemotherapyresistant pancreatic cancer side population cells. **International Journal of Oncology**. v. 49, p. 99-110, 2016.

ZHAO, R. et al. Designer and natural peptide toxin blockers of the KcsA potassium channel identified by phage display. **PNAS**. v. 112, n. 50, p. 7013-7020. 2015.

ZHOU, J. et al. Resistance to drug by different isolates *Trypanosoma evansi* in China. **Acta Tropica**. v 90, p 271–275, 2004.

ZOLLER, F. et al. Miniproteins as Phage Display-Scaffolds for Clinical Applications. **Molecules**. v. 16, p. 2467-2485, 2011.