

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

JULIO CESAR MORAES

**DESENVOLVIMENTO DE BIBLIOTECAS DE *PHAGE DISPLAY* PARA A
OBTENÇÃO DE MARCADORES E/OU INIBIDORES BIOLÓGICOS CONTRA
Trypanosoma evansi.**

**LAGES, SC
2017**

JULIO CESAR MORAES

**DESENVOLVIMENTO DE BIBLIOTECAS DE *PHAGE DISPLAY* PARA A
OBTENÇÃO DE MARCADORES E/OU INIBIDORES BIOLÓGICOS CONTRA
Trypanosoma evansi.**

Tese apresentada no programa de Pós-graduação em
Ciência Animal do Centro de Ciências
Agroveterinárias, da Universidade do Estado de
Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção
do grau de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Miletti

Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo Felipe da Silva

**LAGES, SC
2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com
auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

Moraes, Julio Cesar

DESENVOLVIMENTO DE BIBLIOTECAS DE PHAGE DISPLAY
PARA A OBTENÇÃO DE MARCADORES E/OU INIBIDORES
BIOLÓGICOS CONTRA Trypanosoma evansi / Julio Cesar
Moraes. - Lages , 2017.
115 p.

Orientador: Luiz Claudio Milette

Co-orientador: Gustavo Felipe Da Silva
Tese (Doutorado) - Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Lages, 2017.

1. Trypanosoma evansi. 2. Phage display. 3.
Kunitz. 4. Diagnóstico. 5. Tripanocida. I. Milette,
Luiz Claudio. II. Da Silva, Gustavo Felipe. ,
.III. Universidade do Estado de Santa Catarina,
Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

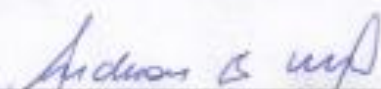
JULIO CESAR MORAES

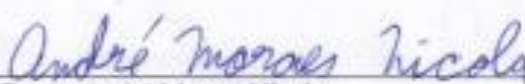
**DESENVOLVIMENTO DE BIBLIOTECAS DE PHAGE DISPLAY PARA A
OBTENÇÃO DE MARCADORES E/OU INIBIDORES BIOLÓGICOS CONTRA
Trypanosoma evansi.**

Tese apresentada no programa de Pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

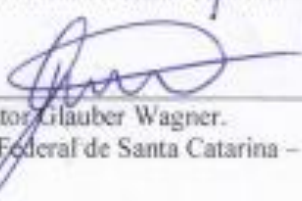
Banca Examinadora

Orientador: 
Professor Doutor Luiz Claudio Miletto.
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

Membro: 
Professor Doutor Anderson Barbosa de Moura.
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

Membro: 
Professor Doutor André Moraes Nicola.
Universidade Nacional de Brasília – UNB.

Membro: 
Professor Doutor Álvaro Menin.
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

Membro: 
Professor Doutor Glauber Wagner.
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

Lages, 12 de julho de 2017.

DEDICATÓRIA

A minha mãe Idi e ao meu irmão Rafael que nunca mediram esforços, e sempre me incentivaram, dando todo o apoio para que eu conseguisse alcançar meus objetivos.

A minha namorada Bruna por todo apoio e pelo valoroso auxílio prestado para a conclusão desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, em primeiro lugar, a Deus, pela força e coragem durante toda esta caminhada.

A minha mãe Idi, ao meu irmão Rafael que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu concluísse mais esta etapa.

A minha namorada Bruna, pelo carinho, incentivo e compreensão que vem me prestando nesses últimos anos.

Aos Profs. Dr. Luiz Claudio Miletti e Dr. Gustavo Felipe da Silva, pelos ensinamentos e tempo dedicado na orientação para a construção desta Tese.

A Prof. Dra. Maria de Lourdes Borba Magalhães pela oportunidade, aprendizado e dedicação durante o período experimental.

A Prof. Dra. Beatriz Simonsen Stolf pelas importantes sugestões durante a qualificação, que contribuíram com este trabalho.

A Universidade do Estado de Santa Catarina, pela oportunidade de realização do Doutorado junto ao curso de Pós-Graduação em Ciências Animal.

Ao Laboratório de Protozoologia da UFSC, em nome do Prof. Dr. Edmundo C. Grisard, pela cessão das amostras de *T. cruzi* e *T. rangeli*.

A CAPES, pela concessão da bolsa.

Aos meus colegas de laboratório pelo companheirismo e amizade.

E a todos aqueles que de uma forma ou outra me ajudaram a vencer mais esta etapa, meu muito obrigado!

“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o Céu, enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe”.

Leonardo da Vinci

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.

ABSTRACT

MORAES, Julio Cesar. **Development of *phage display* libraries for obtaining markers and/or biological inhibitors against *Trypanosoma evansi***. 2017. 115 f. Thesis (DSc in Animal Science). Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2017.

Trypanosoma evansi is a parasitic hemoprotozoan, which causes the disease known as "surra" or "mal das cadeiras" and has been described in several species, such as dogs, capybaras, quatis, cattle, buffaloes, and horses are the most affected species. It is responsible for direct losses in the equinoculture sector and indirect in the livestock sector that use this species in the handling of other production animals. *T. evansi* is transmitted acyclically by insects (Tabanidae and Stomoxyidae) and hematophagous bats and iatrogenically (vaccinations, collection of blood). With the objective of identify new compounds for the control and / or diagnosis of *T. evansi*, We used phage display technology associated with Kunkel's mutagenesis technique aimed at constructing a protein library with diversity of more than one million distinct proteins and even after diversification, the library retained as a structural basis the protein skeleton of an attenuated toxin with Kunitz Domain present in the venom of *Mesobuthus tamulus* scorpion. The mutations were directed, with the support of the crystallographic structure of the toxin, to specific residues in the C-terminal portion of the α -helix and in the smaller loop of the protein. The mutant DNA was purified and amplified by the Selective Rolling Circle technique. Clones from the library were sequenced, where a close to 100% rate of insertions of specific residue mutations was evidenced. Then the library was used in affinity selections against *T. evansi* to search for specific ligands to the parasite. After one round in vivo and two in vitro, six clones were selected for individual studies of potency, binding specificity and toxicity. Among all clones, in particular, clones 5 and 1 showed a greater potential for binding to *T. evansi* and lack of binding against other trypanosomatids (*T. cruzi* and *T. rangeli*). Clones 1, 2 and 5 proved to be toxic to *T. evansi* causing a mortality of 13%, 31.5% and 19.7%, respectively. DNA from clones 1, 2 and 5 were sequenced, demonstrating that mutations were inserted. The toxin-derived library as well as clones 1 and 5 identified has potential for the development of new tests for the direct diagnosis of *T. evansi*. Clones 1, 2 and 5 that demonstrated toxic activity may serve as the basis for other studies aimed at the development of new drugs with trypanocidal activity.

Palavras-chave: *Trypanosoma evansi*. *Phage display*. *Kunitz*. Diagnosis. Trypanocidal.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Campo microscópico mostrando *Trypanosoma evansi* em esfregaço sanguíneo corado com Panótico Rápido® (aumento de 1000x).....25
- Figura 2** - Equino com “surra”, apresentando transtornos locomotores.....26
- Figura 3** - Ciclo do *Trypanosoma evansi*28
- Figura 4** - Distribuição do *Trypanosoma evansi* no mundo: Em verde escuro, regiões onde *T. evansi* está presente; em verde claro, regiões onde não foram disponibilizadas informações, porém a presume-se a ocorrência de *T. evansi*; e em cinza, regiões onde ocorreram surtos, porém *T. evansi* foi erradicado31
- Figura 5** - Esquema do ciclo de replicação de bacteriófagos filamentosos: o fago M13 utiliza a PIII para se ligar ao pilus da *E. coli*, então a proteína TolA despolimeriza o capsídeo protéico do fago. A simples fita (ssDNA) é liberada no citoplasma, convertida a uma dupla fita (dsDNA), replicada e expressada utilizando a maquinaria da célula hospedeira. Os dímeros da proteína pV juntamente com o ssDNA iniciam a produção da partícula viral, então, a pV é substituída pela pVIII no canal formado pelas proteínas pI, pXI, pIV e uma tioredoxina do hospedeiro. Finalmente o fago maduro é liberado sem causar lise na bactéria37
- Figura 6** - Estrutura da toxina BTK-2 (*Mesobuthus tamulus*): α -hélice (azul), folha- β (vermelho), *loop* (verde), pontes de dissulfeto (laranja).....44
- Figura 7** - Estrutura da toxina BTK-2 (*Mesobuthus tamulus*): local da mutação no *loop* menor (azul); local da mutação na região C-terminal da α -hélice (vermelho).....49
- Figura 8** - Mapa do vetor fagomídeo APIII6: o gene da proteína de Domínio Kunitz BTK-2mut com as regiões de restrição *HindIII* e *Sall* foi clonado no vetor, resultando em um gene quimérico com o OmpA N-terminal (sequência de

exportação), o epítipo FLAG (para imunodeteção) e a porção C-terminal da PIII	51
Figura 9 - Reações de ligação do gene da BTK-2 <i>mut</i> ao vetor pAPIII6.....	55
Figura 10 - Produção do híbrido de DNA heteroduplex: em vermelho, DNA <i>mutante</i> e em verde DNA <i>origem</i> uracilado. A heteroduplex foi construída a partir do anelamento de <i>primers</i> degenerados nas regiões onde se deseja inserir mutações ao gene da proteína exógena, inserida no fagomídeo	64
Figura 11 - Coleta de sangue por punção cardíaca em um camundongo infectado com <i>T. evansi</i>	69
Figura 12 - Cromatografia do sangue dos camundongos infectados através de coluna de DEAE - celulose para separação de formas tripomastigotas de <i>T. evansi</i> dos leucócitos murinos	70
Figura 13 - <i>Round in vivo</i> . Um camundongo infectado com <i>T. evansi</i> foi inoculado com a biblioteca pAPIIIK2-4, após 45 minutos, o animal foi sacrificado e o sangue foi coletado. Então o sangue foi centrifugado em gradiente de Percoll® para separação do precipitado de leucócitos. O <i>T. evansi</i> foi separado dos leucócitos por cromatografia. Após a separação, os fagos ligantes foram eluídos do <i>T. evansi</i> com HCl (100 mM), o sobrenadante recuperado e a proteína BTK-2 redobrada com a adição de Tris-HCl pH 11. Finalmente o fago foi utilizado para infectar <i>E. coli</i> XL1B e titulado	71
Figura 14 - <i>Round in vitro</i> – Método BRASIL. O <i>T. evansi</i> foi incubado com a biblioteca pAPIIIK2-4 (Fago R1), o <i>T. evansi</i> e o <i>T. evansi</i> ligado ao Fago R1 foram separados por centrifugação através da fase orgânica. O precipitado obtido na fase orgânica foi recuperado após o congelamento do tubo. Em seguida os fagos ligantes foram eluídos do <i>T. evansi</i> com HCl (100 mM), o sobrenadante recuperado e a proteína BTK-2 redobrada com a adição de Tris-HCl pH 11. Finalmente o fago foi utilizado para infectar <i>E. coli</i> XL1B e titulado	74

- Figura 15** - Eletroforese em gel de agarose a 1% da PCR, para a confirmação da construção da proteína BTK-2*mut*: (1) marcador de massa molecular de 100pb; (2) reação da PCR. Ambos corados com GelRed[®] (Biotium[®])....80
- Figura 16** - Eletroforese em gel de agarose a 1% da PCR, para a confirmação da construção da proteína BTK-2*mut*: (1) marcador de massa molecular de 100pb; (2, 3, 4, 5 e 6) reação da PCR. Ambos corados com GelRed[®] (Biotium[®]).....81
- Figura 17** - Eletroforese em gel de agarose a 1% da PCR, para a confirmação da construção da proteína BTK-2*mut* no clone 8, utilizando várias combinações de *primers* para a produção de diferentes tamanhos de amplicons: (1) marcador de massa molecular de 100pb; reações da PCR: (2) P1/P5, (3) P1/P4 e (4) P2/P4. Ambos corados com GelRed[®] (Biotium[®]).....82
- Figura 18** - Eletroforese em gel de agarose a 1% da digestão com as enzimas *Sall* e *HindIII* para a excisão da banda contendo o gene BTK-2*mut*: (1) marcador de massa molecular de 20pb; (2) Plasmídeo 8 não digerido, (3) Plasmídeo 8 digerido e (4) PCR do plasmídeo 8 com os primers P1/P5. Ambos corados com GelRed[®] (Biotium[®]).....83
- Figura 19** - Eletroforese em gel de agarose a 1% da digestão com as enzimas *Sall* e *HindIII* para a excisão da banda contendo o vetor pAPIII6 sem o gene scfv D5: (1) marcador de massa molecular de 1Kb; (2) PJH3 WT D5 digerido, (3) PJH3 WT D5 não digerido. Ambos corados com GelRed[®] (Biotium[®])84
- Figura 20** - Eletroforese em gel de agarose a 1% da PCR, para a verificação da clonagem da proteína BTK-2*mut* no fagomídeo pAPIII6 utilizando os *primers* P1/P5: (1) marcador de massa molecular de 20pb; (2 a 17) PCR de colônias e (18) controle negativo. Ambos corados com GelRed[®] (Biotium[®]).....85
- Figura 21** - Alinhamento da sequência do clone 2 com o gene da proteína BTK-2*mut*86
- Figura 22** - Placa de LB com Top Agar, utilizada para quantificação da produção do *helper phage*. A contagem das UFP foi feita na diluição 10⁻⁵87

- Figura 23** - Eletroforese do Gel de SDS-PAGE de 16%, utilizado para verificação da expressão da proteína junto a PIII do fago: (1) marcador de massa molecular produzido pelo LABHEV; (2) Fago BTK-2*mut*, (3) Fago D5, (4) *helper phage*. Ambos corados com Coomassie Blue87
- Figura 24** - *Western Blotting*, utilizado para verificação da expressão da proteína junto a PIII do fago, por meio da imunolocalização da FLAG na membrana de nitrocelulose: (1) marcador de massa molecular produzido no LABHEV: 93 kDa (KOD), 53 kDa (BGLA) e 14 kDa (Lisozima); (2) Fago BTK-2*mut*; (3) Fago D5; (4) *helper phage*., (2) Fago BTK-2*mut*, (3) Fago D5, (4) *helper phage*88
- Figura 25** - Eletroforese em gel de agarose a 1% da reação *Kunkel* mutagênese, utilizada para a montagem da fita de DNA heteroduplex a partir da ss(U)DNA: (1) marcador de massa molecular de 100pb; (2) ss(U)DNA e (3) DNA Heteroduplex. Ambos corados com GelRed® (Biotium®).....89
- Figura 26** - Placa de LB / Amp, utilizada para quantificação da biblioteca pAPIIK2-4. As colônias foram quantificadas na segunda diluição.....90
- Figura 27** - Gráfico gerado na citometria de fluxo com o *T. evansi* tratado com os clones 1, 2, 3, 5 e os controles BTK-2*mut* e somente o parasito. Quanto mais avança no eixo X, maior é a fluorescência captada do FITC e quanto mais alta é a curva no eixo Y, maior é o número de eventos que representam a parcela de indivíduos marcados com o anti-camundongo marcado com FITC. As legendas ao lado do gráfico indicam a curva de cada um dos clones avaliados.....95
- Figura 28** - Gráfico gerado na citometria de fluxo com o *T. evansi* tratado com os clones 1, 2 e 5 e o *helper phage* (controle). Quanto mais avança no eixo X, maior é a fluorescência captada do iodeto de propídio (sonda para identificação de células mortas). A curva no eixo Y indica o número de eventos ocorridos.....96
- Figura 29** – Gráfico gerado na citometria de fluxo com o *T. evansi* tratado com os clones 3 e 4 e o *helper phage* e a BTK-2 como controles. Quanto mais avança no eixo X, maior é a fluorescência captada do iodeto de propídio

(sonda para identificação de células mortas). A curva no eixo Y indica o número de eventos ocorridos.....97

Figura 30 – Gráfico gerado a partir dos dados obtidos na citometria de fluxo com a utilização do iodeto de propídio para a identificação dos *T. evansi* mortos após o tratamento com os clones 1, 2, 3, 4 e 5. Tratamento com os controles helper phage e a BTK-2 e o *T. evansi* sem tratamento98

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - *Primers* utilizados no *overlapping* para a montagem do gene da BTK-2. Em destaque (sublinhado) os locais de restrição das enzimas *Sall* (P1) e *HindIII* (P5)50
- Tabela 2** - Sequência da BTK-2*mut* depois do *overlapping* dos *primers*. Em destaque (sublinhado) os locais de restrição das enzimas *Sall* e *HindIII*, respectivamente50
- Tabela 3** - Substituições dos aminoácidos valina, glicina, alanina, glutamina, prolina, metionina e histidina (sublinhado) da α -hélice da BTK-2 por argininas (sublinhado) na BTK-2*mut*51
- Tabela 4** - *Primers* degenerados utilizados para a *Kunkel* mutagênese, sublinhada a região para a inserção das mutações (S=G/C e N=A/G/C/T)63
- Tabela 5** - Tradução do sequenciamento de 6 clones escolhidos aleatóreamente para a verificação da inserção de mutações no esqueleto protéico BTK-2*mut* (pAPIIIK2) da biblioteca pAPIIIK2-4. Em negrito a região de inserções de mutação da α -hélice, e sublinhado a região de inserções de mutação no *loop* menor. O asterisco significa a presença de stop códon.91
- Tabela 6** - Resultados obtidos nos três *rounds* de seleção contra o *T. evansi*92
- Tabela 7** - Resultados obtidos após o estudo de ligação ao *T. evansi* dos seis clones escolhidos após o terceiro *round* de seleção93
- Tabela 8** - Tradução do sequenciamento de 6 clones escolhidos aleatoriamente para os tetes de afinidade contra o *T. evansi*. Em negrito a região de inserção de mutações da α -hélice, e sublinhado a região de inserções de mutação no *loop* menor. O asterisco significa a presença de stop códon94

LISTA DE ABREVIACES

ACRS	Amplificao por Círculo Rolante Seletivo.
APPI	Inibidor do precursor da β -proteína.
APOL1	Apoliprotena L-I.
ATP	Trifosfato de adenosina.
BPTI	Proteína inibidora da tripsina pancretica bovina.
BTK-2	Peptídeo isolado da toxina do <i>M. tamulus</i> .
BTK-2 ^{mut}	Peptídeo isolado da toxina do <i>M. tamulus</i> com a substituio de aminoácidos na α -hlice por argininas.
BRASIL	Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands.
BSA	Soro albumina bovina
cAb-An33	Nano anticorpo.
CATT	Card Agglutination Test <i>Trypanosoma</i> .
CD4M33	Peptídeo anti-gp120 (HIV).
CJ236	Linhagem de <i>Escherichia coli</i> .
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DH10 B	Linhagem de <i>Escherichia coli</i> .
DNA	cido desoxirribonucleico.
dNTP	Deoxinucleotdeos trifosfatos.
DTT	Ditiotreitol.
dsDNA	Dupla fita de DNA.

DX-88	Proteína para o tratamento do angioedema hereditário.
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético.
EPI-hNE4	Depelstat [®] .
ESAG	Genes associados ao local de expressão.
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i> .
FITC	Isotiocianato de fluoresceína.
FL1A	Canal de leitura do citometro de fluxo.
FL2A	Canal de leitura do citometro de fluxo.
<i>g</i>	Força da gravidade.
HNE	Elastase Neutrófila Humana.
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside.
Kg	Quilograma.
kDa	Quilo daltons.
LB	Meio de crescimento “Luria-Bertani”.
LB / Amp	Meio de crescimento “Luria-Bertani” com ampicilina.
LB / Tet	Meio de crescimento “Luria-Bertani” com tetraciclina.
LiTat1.3 e 1.5	Anticorpos anti- <i>T. gambiense</i> .
M	Molar ou molaridade (mol/l).
M13KO7	Helper phage.
mA	Miliampere.
mM	Milimolar.
mL	Mililitro.

Nb392	Nano anticorpo.
ng	Nanograma.
pAPIII6	Vetor fagomídeo derivado do pCANTAB5E.
pAPIIIK2	Vetor fagomídeo com o gene da proteína BTK-2 <i>mut.</i>
pAPIIIK2-4	Biblioteca da proteína BTK-2.
PBS	Tampão fosfato salino.
PBS-G	Tampão fosfato salino com glicose.
PBT	Tampão fosfato salino com BSA e Tween 20 [®] .
PT	Tampão fosfato salino com Tween 20 [®] .
PCR	Polymerase chain reaction.
PEG 8000	Polietileno glicol 8000.
PFR1	Proteína conservada paraflagelar Rod.
PFU	Pyrococcus furiosus.
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis.
pb	Pares de base.
Pg	Picograma
PJH3 WT D5	Vetor pAPIII6 com o gene do ScFv D5 (Anti-gp41, HIV).
RAPD	Random amplification of polymorphic DNA.
RoTat1.2	Cepa referência de <i>T. evansi</i> .
RFLP	Restriction fragment length polymorphism.
RPM	Rotações por minuto.
SDS	Dodecil sulfato de sódio.

ssDNA	Simples fita de DNA.
ss(U)DNA	Simples fita de DNA uracilado.
SOC	Super optimal broth catabolic repressuion.
SRA	Proteína associada à resistência do soro.
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i> .
TbHKT1	Gene do canal de K ⁺ do <i>T. brucei</i> .
TNF	Fator de necrose tumoral.
Tris-HCl	Trisaminometano hidrocloreida.
U	Unidades.
UDG	Uracil-DNA Glicosilase.
UFP	Unidade formadora de placa.
µg	Micrograma.
µL	Microlitro.
V	Volts.
VHH	Anticorpo de domínio único.
VSG	Glicoproteína variante de superfície.
W	Watts.
X-GAL	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside.
XL1Blue	Linhagem de <i>Escherichia coli</i> .
XL1Blue - M13KO7	Linhagem de <i>Escherichia coli</i> contendo o helper phage.
1ICA29	Defensina A de 29 aminoácidos.
2YT	Meio “Luria-Bertani” duas vezes concentrado.

2YT / Tet.	“Luria-Bertani” duas vezes concentrado com tetraciclina.
2YT / Kan	“Luria-Bertani” duas vezes concentrado com Kanamicina.
4PEG–DX- 1000	Peptídeo peglado de alta a plasmina.

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 KUNITZ BTK-2MUT.	80
6.2	CLONAGEM DO GENE DA PROTEÍNA DE DOMÍNIO KUNITZ BTK-2MUT NO PGEM-T EASY®	81
6.2.1	PCR com várias combinações de primers para a confirmação da proteína de Domínio Kunitz BTK-2mut no clone 8 (vetor pGEM-T Easy®)	81
6.3	CLONAGEM DA PROTEÍNA DE DOMÍNIO KUNITZ 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</i> BTK-2mut	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 BTK-2mut no pAPIII6	85
6.3.4.1	Reação da PCR para triagem de colônias positivas para o gene BTK-2mut ..	85
6.3.4.2	Sequenciamento do clone 2 – BTK-2mut. 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 BTK-2mut.	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

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

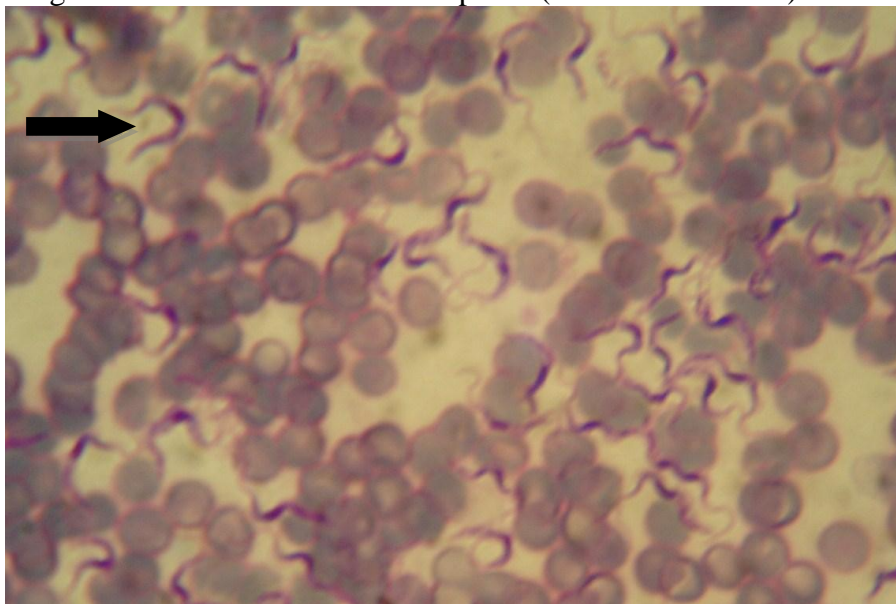
1.1 *Trypanosoma evansi*

1.1.1 Aspectos gerais

O *Trypanosoma evansi* (Figura 1) é um hemoprotozoário pertencente à família Trypanosomatidae, seção salivaria. Segundo Lai et al., (2008) *T. evansi* difere do *Trypanosoma brucei* pela ausência do cinetoplasto, não constituindo outro clado, portanto, é considerado por alguns autores uma subespécie do *T. brucei*. No entanto, devido às diferentes características biológicas, *T. evansi* continua sendo considerado uma espécie pela maioria dos autores (DESQUESNES, 2004; GIBSON, 2007).

É a espécie mais difundida em rebanhos comerciais ou de subsistência nas regiões tropicais e subtropicais. À exemplo do *T. cruzi*, é capaz de parasitar uma ampla gama de animais domésticos e selvagens. Equinos, asininos e camelos estão entre os hospedeiros mais sensíveis, podendo parasitar ainda, búfalos, cães, gatos e animais sinantrópicos como quatis (*Nasua nasua*) e a capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) que é considerada reservatório natural do parasito (DESQUESNES, 2004). Na região do Pantanal Matogrossense, Herrera et al., (2004) encontraram inúmeras espécies parasitadas por *T. evansi* (cavalo, capivara, coati, cão, bovino, marsupial, pequenos roedores, morcego e tatu).

Figura 1 – Campo microscópico mostrando *Trypanosoma evansi* em esfregaço sanguíneo corado com Panótico Rápido[®] (aumento de 1000x).



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Foi primeiramente descrito na Índia por Griffith Evans em 1880 (DESQUESNES, 2004). Acredita-se que a entrada do *T. evansi* no continente americano ocorreu com o ingresso de cavalos, introduzidos pelos conquistadores espanhóis, por volta do século XVI (DESQUESNES et al., 2013a). No Brasil, o *T. evansi* foi primeiramente descrito em 1827 parasitando búfalos na Ilha de Marajó e em 1850 foi descrito acometendo equinos do Pantanal Matogrossense (DESQUESNES et al., 2013a). Os equinos são os animais mais sensíveis à infecção, nesses o *T. evansi* é responsável pela enfermidade conhecida como “Surra” ou “Mal das Cadeiras”, assim denominada por causar transtornos locomotores (Figura 2). Em equinos acometidos pelo *T. evansi*, apresentando sinais clínicos como ataxia progressiva, nistagno, cegueira, hiperexcitabilidade e déficits proprioceptivos foram encontrados tripanossomatídeos no sistema nervoso central (BERLIN et al., 2009; RODRIGUES et al., 2009). Animais infectados desenvolvem um quadro de anemia, conjuntivite, edema nos membros locomotores e partes inferiores do corpo, fraqueza progressiva, aparecimento gradual de paresia nos membros posteriores (SILVA et al., 1995) e hipertermia, podendo chegar a 41°C, e quando não tratados, evoluem para a morte (FORTES, 2004).

Figura 2 – Equino com “surra”, apresentando transtornos locomotores.



Fonte: Rodrigues et al., (2005).

O *T. evansi* tem sido muitas vezes negligenciado, pois, apesar de parasitar um amplo número de espécies de animais, em geral, são criadores e proprietários de equinos que compõem o grupo mais susceptível aos prejuízos causados pelo parasito. Os cavalos são muito utilizados na pecuária extensiva no Brasil (SEIDL et al., 2001). Segundo Frank et al., (1994) na região do Poconé no Pantanal Matogrossense, importante na pecuária extensiva, a tripanossomose causada pelo *T. evansi* é endêmica. Seidl et al., (1998) estimam que o custo com a tripanossomose equina no Pantanal seja de aproximadamente US\$ 2,4 milhões. Na Venezuela o custo com a doença foi estimado em 2008, na ordem de US\$ 7,4 milhões (MORENO et al., 2013).

1.1.2 Infecção de humanos pelo *Trypanosoma evansi*

O potencial zoonótico do *T. evansi* não tem recebido muita atenção, pois, ainda são poucos os relatos de casos em humanos, um dos motivos é a presença do fator tripanolítico no soro, desempenhado principalmente pela apoliproteína L-I (APOL1). Essa proteína interage com a bicamada lipídica do parasito em pH ácido, no endossomo. Após a neutralização do pH, estimula a abertura de canais seletivos de cátions na

membrana plasmática, causando uma turgidez em tripanosomatídeos susceptíveis, culminando com a lise celular (THOMSON e FINKELSTEIN, 2015).

O primeiro caso de tripanossomose causado por *T. evansi* em humanos foi relatado em 2005 na Índia. Um pecuarista de 45 anos foi acometido pelo parasito (JOSHI et al., 2005). O paciente demonstrou não possuir atividade tripanolítica no plasma, devido a uma mutação nos alelos da APOL1 (VANHOLLEBEKE et al., 2006).

A infecção por tripanosomatídeos em humanos que produzem corretamente a APOL1 pode ser ocasionada por parasitos que possuam uma proteína, denominada proteína associada à resistência do soro (SRA) que interage com a APOL1, evitando a ação tripanocida desta proteína do soro, conforme ocorre com as espécies causadoras da tripanossomose africana (*T. brucei rhodesiense* e *T. brucei gambiense*). Em amostras de parasitos resistentes, verificou-se que a expressão de genes tipo ESAGs, presentes na região telomérica do cromossomo que contém vários genes ligados a expressão das VSG (glicoproteínas de superfície variáveis), produzem a SRA (XONG et al., 1998).

Recentemente foi relatado o primeiro caso de tripanossomose causado por *T. evansi* em um paciente que possuía uma produção normal de APOL1, o caso ocorreu no sudeste da Ásia, uma vietnamita de 38 anos, contraiu o parasito durante a manipulação de carne (CHAU et al., 2016).

1.1.3 Transmissão do *Trypanosoma evansi*

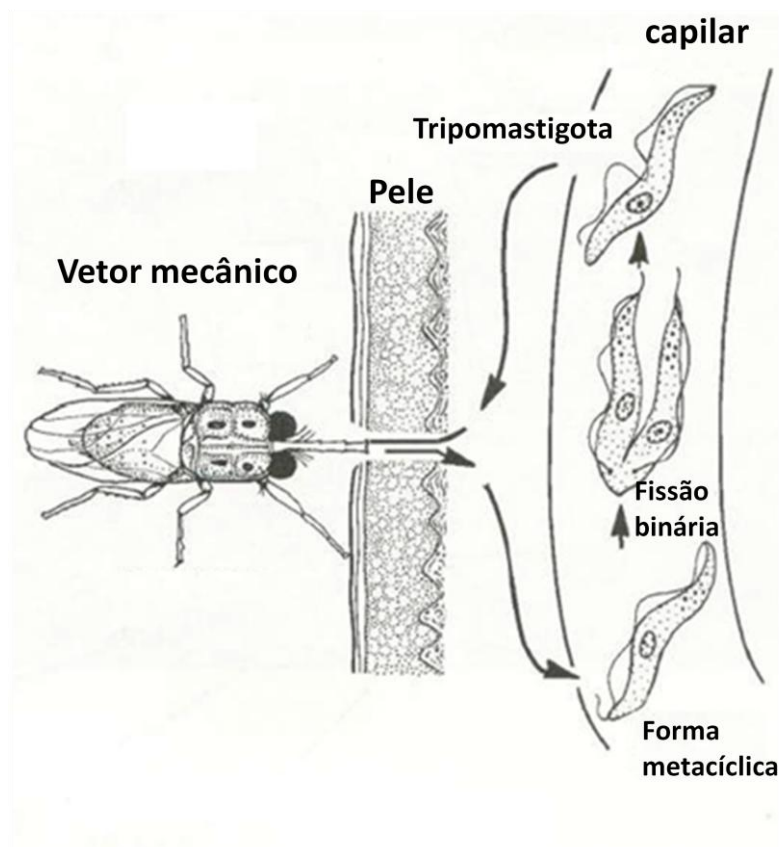
No continente Africano o *T. brucei* é transmitido de forma cíclica pela mosca *Glossina palpalis* (tsé-tsé) seu hospedeiro intermediário (DESQUESNES, 2004). Acredita-se que o *T. evansi* tenha evoluído do *T. brucei*, motivo pelo qual o *T. evansi* e o *T. equiperdum*, causadores respectivamente da “surra” e “durina”, são considerados como subespécies do *T. brucei* por muitos autores. A análise do genoma de uma amostra chinesa de *T. evansi* comparada com uma cepa padrão de *T. brucei*, apresentou uma similaridade de 94,9% (CARNES et al., 2015). No entanto, o *T. evansi* não possui hospedeiro intermediário, durante a evolução o *T. evansi* perdeu o maxicírculo do DNA cinetoplástico mitocondrial e tornou-se incapaz de prosseguir com a transmissão cíclica no mosquito da espécie *Glossina palpalis* (LAI et al., 2007; AUTY et al., 2015).

1.1.3.1 Ciclo biológico *T. evansi*

O *T. evansi* apresenta-se apenas na forma tripomastigota, encontrada no sangue de vertebrados e é transmitido de forma acíclica por meio de vetores mecânicos, sendo carregado na probóscide após o repasto sanguíneo por insetos picadores, pertencentes às famílias *Tabanidae*, *Culicidae*, *Hippoboscidae* e subfamília *Stomoxydinae*, e novamente inoculado em outros hospedeiros durante novo repasto (Figura 03). O parasito ainda pode ser transmitido por morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*), também considerados reservatórios do *T. evansi*. Outras formas de transmissão como a iatrogênica, oral e a congênita foram relatadas (DESQUESNES et al., 2013b). O ciclo do *T. evansi* é direto, ou seja, não há uma fase de desenvolvimento em hospedeiros intermediários, conforme ocorre com *T. brucei* na *Glossina palpalis* (LAI et al., 2008).

Devido à ampla gama de vetores e espécies hospedeiras o *T. evansi* possui grande potencial de propagação e disseminação para regiões não endêmicas, levando à possibilidade de surtos esporádicos (DESQUESNES, 2004).

Figura 3 – Ciclo do *Trypanosoma evansi*



Fonte: Adaptado de Gardiner et al., (1998)

1.1.4 Imunidade contra o *Trypanosoma evansi*

A imunidade do hospedeiro contra a forma tripomastigota de *T. evansi*, presente no sistema circulatório de animais infectados, está principalmente ligada à imunidade humoral. Na fase inicial da infecção por *T. evansi* ocorre um aumento da produção de moléculas como, por exemplo, o fator de necrose tumoral (TNF), interferon- γ e óxido nítrico, porém, Baral et al., (2007) observaram que somente a imunoglobulina IgM foi capaz de auxiliar no controle da infecção pelo parasito. No entanto, o *T. evansi*, possui na sua membrana Glicoproteínas Variantes de Superfície (VSG) que promovem a evasão do parasito ao reconhecimento, e ataque do sistema imune por meio da produção anticorpos específico (HERRERA et al., 2004; STOCO et al., 2017). As VSGs são proteínas utilizadas por vários agentes para evadir da defesa dos seus hospedeiros. No *T. evansi*, as VSGs consistem em uma densa cobertura de glicoproteínas que recobrem outros epitopos menores conservados presentes na superfície do parasito. As VSG são variáveis, portanto, a resposta imune gerada contra esse tipo de epitopo muitas vezes não promove uma resposta consistente contra o *T. evansi* (STIJLEMANS et al., 2004). Portanto, tem-se procurado outros possíveis alvos, mais estáveis, com o objetivo de produzir uma vacina eficaz, como por exemplo, a proteína β -tubulina que constitui os microtúbulos do citoesqueleto (LUBEGA et al., 2002; LI et al., 2007) e outros epitopos menores e menos imunogênicos, porém conservados, presentes nas criptas das VSGs (STIJLEMANS et al., 2004).

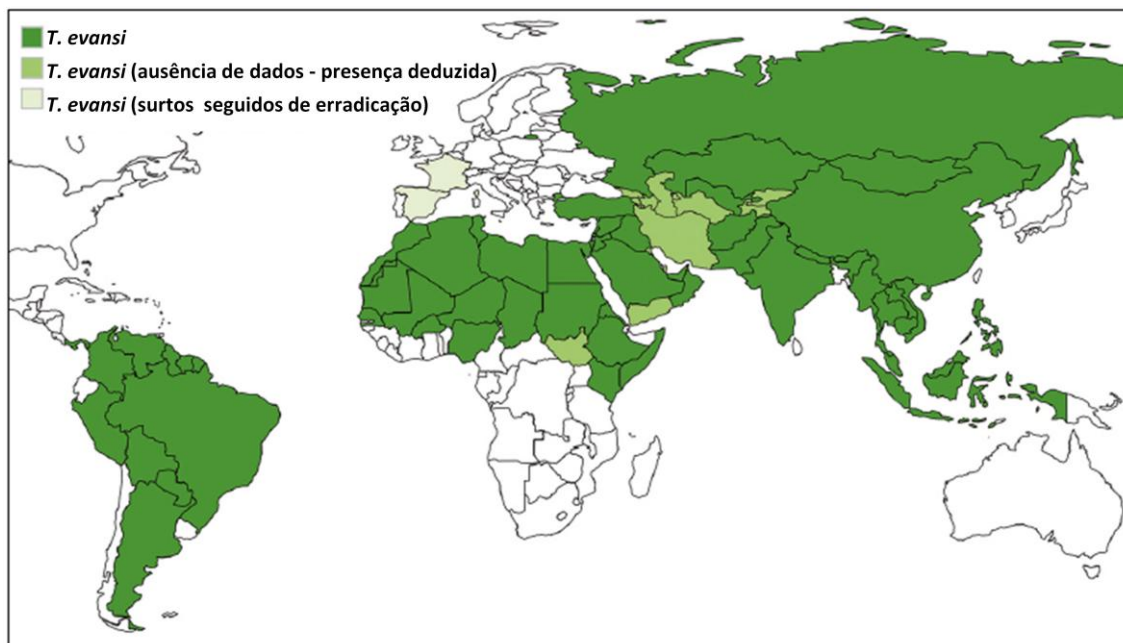
1.1.5 Distribuição e epidemiologia

O *T. evansi* está amplamente distribuído pelo mundo (Figura 4), estando presente na América do Sul e Central, no continente Africano, Ásia e algumas regiões da Europa e Oceania (DESQUESNES et al., 2013a).

No Brasil na região do Pantanal Matogrossense a “surra” é endêmica, a ocorrência de surtos e outros estudos epidemiológicos conduzidos em várias regiões do país têm demonstrado a presença do *T. evansi*. Frank et al., (1994) utilizaram o ELISA, do Inglês *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*, indireto para detecção de *T. evansi* em um estudo na região norte do Pantanal e encontraram em: 9,6% dos cavalos, 4,2%

dos bovinos, 18,6% dos cães e 14% das capivaras amostradas. Herrera et al., (2004), utilizando a PCR encontraram um grande número de espécies de animais domésticos e selvagens parasitados na região sul do Pantanal (34,9% em cavalos, 8,8% em bovinos, 41,9% em búfalos, 9,8% em cães e 29,2% em capivaras). Também ocorreu a descrição de casos de *T. evansi* em equinos, no Rio Grande do Sul (RODRIGUES et al., 2005), em Itabira, Minas Gerais (NUNES et al., 2010) e em bovinos de leite em Videira, Santa Catarina (DA SILVA et al., 2007). No município de Chaves, Ilha de Marajó – PA, Da Silva et al., (2016) descreveram dois surtos confirmados por imunohistoquímica, em 2011, em uma fazenda com um total de 147 equinos, houve 40 mortes e em 2012, em nove propriedades ocorreram 183 mortes de equinos. Em um levantamento epidemiológico feito em equinos, por meio da PCR, em cinco municípios da região do Arari, Ilha de Marajó – PA, foi confirmada a presença de *T. evansi* em 40 de 243 amostras de sangue coletadas (DA SILVA et al., 2016). Parreira et al., (2016) coletaram amostras de sangue nos meses de janeiro e dezembro de 2012, e abril de 2013, em duas fazendas do Pantanal Matogrossense distantes 30 km uma da outra. A imunofluorescência indireta revelou positividade em 70,7% dos animais jovens no início da estação chuvosa e 81% no período de inundação, final das chuvas, e em animais adultos foi encontrado 42% de sorospositivo no início da estação e 68% no final do período das chuvas (PARREIRA et al., 2016).

Figura 4 – Distribuição do *Trypanosoma evansi* no mundo: Em verde escuro, regiões onde *T. evansi* está presente; em verde claro, regiões onde não foram disponibilizadas informações, porém a presume-se a ocorrência de *T. evansi*; e em cinza, regiões onde ocorreram surtos, porém *T. evansi* foi erradicado.



Fonte: adaptado de Auty et al., (2015).

1.1.6 Diagnóstico

O diagnóstico de *T. evansi* tem-se baseado nas seguintes técnicas: microscopia, PCR e provas sorológicas como, por exemplo, CATT test / *T. evansi*[®] (Card Agglutination Test *Trypanosoma*), prova em LATEX e ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay). O antígeno utilizado no CATT test / *T. evansi*[®] consiste em *Trypanosomas* inteiros, nas provas em LATEX / *T. evansi* e ELISA / *T. evansi* são utilizadas glicoproteínas (VSG) purificadas. Em ambos os testes, o antígeno utilizado é o clone indonésio, cepa RoTat1.2 (URAKAWA et al., 2001; DESQUENES et al., 2013b).

As características morfológicas e a presença ou ausência de algumas estruturas não podem ser utilizadas com segurança para a identificação da espécie *T. evansi*. Variações morfológicas do *T. evansi* estão fortemente relacionadas com os padrões hematológicos dos hospedeiros durante o desenvolvimento da infecção (TEJERO et al., 2008). A presença ou a forma do cinetoplasto pode variar de acordo com a região de

origem do isolado (DESQUESNES, 2013a). Sánchez et al., (2016) demonstraram que a ultraestrutura do cinetoplasto de três amostras de *T. evansi*, venezuelana, chinesa e colombiana são idênticas, porém, diferem da brasileira que é acinetoplástica.

As técnicas sorológicas são amplamente utilizadas para o diagnóstico de *T. evansi* devido a inúmeras vantagens, dentre as técnicas, pode-se citar o *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA), constitui uma ferramenta prática, de baixo custo e boa reprodutibilidade, que permitem uma grande abrangência, sendo muito utilizada em diagnósticos, levantamentos e estudos de prevalência. Porém, a identificação dos *Trypanosomas* spp., executada por meio de métodos sorológicos, muitas vezes são falhos, devido a reações cruzadas que podem ocorrer com *T. evansi*, *T. vivax*, *T. congolense*, *T. brucei* spp., *T. equiperdum* e *T. cruzi* (DESQUESNES, 2004). Portanto, problemas com a especificidade dessas provas sorológicas pode interferir na precisão da informação obtida e, por conseguinte nos resultados de muitos estudos epidemiológicos de *T. evansi* em determinado tempo e/ou local.

Tem-se demonstrado que antígenos produzidos a partir do *T. evansi* são capazes de reconhecer inespecificamente a resposta sorológica produzida por outras espécies de *Trypanosoma*. Dois antígenos purificados, produzidos a partir de *T. evansi* de 51 kDa e 68 kDa, provenientes da fração citosólica demonstraram ser antígenos reativos para *T. vivax* e *T. evansi* (CAMARGO et al., 2004). O isolado em que se obteve os antígenos de 51 kDa e 68 kDa é o mesmo em que foi encontrado o principal antígeno glicosilado de 64 kDa (p64) que também é imunoreativo para *T. vivax* e *T. evansi* (UZCANGA et al., 2002). A purificação de glicoproteínas (VSG) de sete isolados de *T. evansi*, recuperados de diferentes espécies animais (burro, cavalo e capivara) em regiões distintas da Venezuela, e que se tratavam de diferentes moléculas, geraram resposta imune cruzada com *T. vivax* (CAMARGO et al., 2015). Velásquez et al. (2014), demonstraram reações imunológicas cruzadas entre *T. vivax* e *T. evansi*, utilizando proteínas obtidas de uma purificação parcial da membrana do *T. evansi*. Segundo Auty et al., (2015) testes sorológicos baseados no reconhecimento de VSGs não são totalmente confiáveis.

Conforme ocorre com o ELISA, o CATT test / *T. evansi*[®] (produzido com *Trypanosomas* inteiros) e a prova de LATEX, também têm apresentado reações cruzadas com outros *Trypanosomas* (DESQUESNES, 2004; URAKAWA et al., 2001). Portanto, em áreas endêmicas para outros *Trypanosomas* spp. e o *T. evansi*, podem

ocorrer reações cruzadas, independente do teste sorológico empregado (OIE TERRESTRIAL MANUAL, 2012).

Outras técnicas têm sido utilizadas para estudos de caracterização de amostras de *T. evansi* como, por exemplo: análise de isoenzimas, RFLP, sondas nucleares, sondas do cinetoplasto, sequência do DNA nuclear / cinetoplasto, *fingerprints* elaborados a partir de RAPD, no entanto, muitas vezes são impraticáveis para o uso diário. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem se demonstrado mais sensível que as provas sorológicas (GARI et al., 2010), é considerada a técnica padrão ouro para a identificação do *T. evansi*, porém, quando utilizada para a diferenciação com o *T. equiperdum* demonstrou ser inconstante (DESQUESNES e DÁVILA, 2002; DESQUESNES, 2004). A PCR utilizando *primers* para amplificação do gene VSG (cepa RoTat1.2) foi eficaz para a amplificação do DNA de *T. evansi*, não amplificando os DNAs de *T. b. brucei*, *T. b. gambiense*, *T. b. rhodesiense*, *T. congolense*, *T. vivax* e *T. theileri*, entretanto, sete de nove cepas de *T. equiperdum* foram amplificadas com esses *primers* (CLAES et al., 2004). Singla et al., (2015) compararam o exame parasitológico, com o CATT test / *T. evansi*[®] e a PCR para o diagnóstico de *T. evansi* em bovinos, e concluíram que a PCR foi o teste mais sensível e específico, porém, com maiores custos financeiro e de tempo. Tehseen et al., (2015), no Paquistão, em estudos da prevalência de *T. evansi* em dromedários, concluíram que as provas sorológicas (CATT test / *T. evansi*[®] e o ELISA – RoTat1.2) são mais apropriadas que a PCR devido ao custo e a facilidade de implantação. Porém, após estudos de prevalência do *T. evansi* em cavalos em Bahawalúr, Paquistão, utilizando o CATT test / *T. evansi*[®], Tehseen et al., (2017) sugeriram que os animais soropositivos devem ser confirmados quanto a presença do parasito, por meio da PCR.

1.1.7 Drogas Tripanocidas e a resistência à terapêutica

O médico e missionário britânico David Livingstone foi um dos primeiros europeus a explorarem a África e também foi o primeiro a relatar a ação do arsênico no tratamento da tripanosomose causada pelo *T. brucei* em si próprio, após ter contraído a doença (LIVINGSTONE, 1858). O efeito do arsênico contra o *T. brucei* também foi observado por outros autores naquela época. No entanto, havia o consenso de que o

efeito do tratamento utilizando o arsênico poderia intoxicar e causar a morte do hospedeiro, já que a recrudescência da infecção tornava necessária a retomada do tratamento. A pequena margem de segurança na terapia fez com que Thomas e Breinl concebessem uma das primeiras drogas com maior margem de segurança para o tratamento das tripanossomoses, um composto a base de arsênico chamado de Atoxyl, menos tóxico que outros arsenicais utilizados para o tratamento naquela época (BREINL e TODD, 1907). Após o início do tratamento das tripanossomoses com o Atoxyl, começaram a aparecer cepas resistentes. Então, outras drogas a base de arsênico foram desenvolvidas, Melarsen e Óxido de Melarsen, e apresentaram eficiência contra as cepas resistentes ao Atoxyl (WILLIAMSON e LOURIE 1948).

O número de moléculas utilizadas para o tratamento das tripanossomoses é limitado, atualmente dispõe-se de apenas 06 princípios ativos: aceturato de diminazeno; brometo e cloreto de homidium; cloreto de isometamidium; sulfato de quinapiramina; suramina sódica e diidrocloreto de melarsomina, sendo, os dois últimos mais indicados para o tratamento de *T. evansi* (GIORDANI et al., 2016).

Conforme o que ocorre com outras drogas utilizadas para o tratamento e controle de agentes patogênicos, o *Trypanosoma* spp. tem adquirido resistência a classe de drogas usadas para o controle desses parasitos, conhecida como tripanocidas (UILENBERG, 1998; GIORDANI et al., 2016). Isso se deve principalmente ao mau uso das moléculas empregadas para o tratamento. A utilização recorrente de uma determinada droga gera um ambiente favorável à aquisição da resistência pelos tripanosomatídeos. Ao contrário dos helmintos que adquirem resistência pela seleção dos indivíduos naturalmente resistentes a um princípio ativo, os tripanosomatídeos tornam-se ativamente refratários ao medicamento, não existindo indivíduos naturalmente resistentes, sendo necessário o contato prévio do parasito com o princípio ativo (UILENBERG, 1998). As cepas resistentes tornam-se refratárias ao princípio ativo, mesmo em doses mais elevadas.

Os mecanismos de resistência de cepas de *Trypanosoma* spp. tem sido objeto de estudo já a longo tempo (Williamson e Rollo, 1959), porém, o mecanismo exato da aquisição da resistência pelos tripanosomatídeos ainda não foi completamente elucidado. Alguns mecanismos conhecidos envolvem a diminuição da penetração da droga no organismo devido a mudanças na superfície celular do parasito, outros atuam

na interferência de processos enzimáticos nos locais de atuação da droga (UILENBERG, 1998).

Variantes resistentes a vários princípios ativos utilizados no controle do *T. evansi* têm sido descritas. A melarsomina tem levado à resistência, podendo gerar resistência cruzada com alguns outros arsenicais e parcial ao diaceturato de diminazeno (UILENBERG, 1998). A resistência a esse composto arsenical está relacionada a mudanças na captação de adenosina. Essa droga é carregada no *T. brucei* por um transportador adenosina nucleotídeo, principalmente o P2, portanto, a perda do transportador pelo parasito, está relacionada com o surgimento de resistência (SUSWAM et al., 2001).

Outros princípios ativos também podem gerar resistência cruzada entre as drogas utilizadas na terapêutica das tripanossomoses, são exemplos: a quinapiramina que induz o desenvolvimento de resistência cruzada com isometamidium, brometo de homidium e diminazeno (UILENBERG, 1998), e entre o cloreto de isometamidium com o diaceturato de diminazeno. (DESQUENES, 2004).

Anene et al. (1996) utilizaram antagonistas de cálcio objetivando a reversão da resistência de cepas de *T. evansi* para os seguintes princípios ativos: suramina, diaceturato de diminazeno, melarsomina. Antagonistas de cálcio como o verapamil são utilizados para a reversão de resistência a drogas em células cancerosas, com o objetivo de diminuir a superexpressão da glicoproteína P. Quando presente em grande quantidade na membrana essa proteína aumenta a velocidade de eliminação da droga, evitando que alcance níveis tóxicos (ZHAO et al., 2016). Embora esse mecanismo de resistência também tenha sido encontrado em *T. brucei*, a reversão da resistência com a utilização de antagonistas de cálcio em *T. evansi* não foi verificada (ANENE et al., 1996).

Há relatos de cepas resistentes a drogas nos continentes africano, americano e asiático. No Sudão, 16 isolados de *T. evansi* foram avaliados para resistência a suramina sódica e a maioria se apresentou resistente, apesar dessa droga não ser utilizada desde 1975, no entanto, o sulfato de quinapiramina foi efetivo (EL RAYAH et al., 1999). Na China, 12 isolados de *T. evansi* foram testados para susceptibilidade à suramina sódica, e a infecção de camundongos parasitados com cepas sensíveis foi controlada com uma dose de 3 mg / Kg da droga, enquanto que para as cepas resistentes uma dose 300 vezes maior não foi efetiva (ZHOU et al., 2004). Faccio et al. (2013), testaram três isolados

brasileiros de *T. evansi* e, encontraram que a suramina sódica foi efetiva no controle da parasitose com uma dose de 10 mg / Kg. No Rio Grande do Sul, três doses de 7 mg / Kg de diaceturato de diminazeno apresentaram-se efetivas para o tratamento de equinos parasitados com *T. evansi* (DA SILVA, et al., 2009). Nunes et al. (2012) obtiveram sucesso no tratamento de equinos que apresentavam sinais clínicos de “Surra”, posteriormente confirmado pela PCR, utilizando duas doses de 7 mg / Kg de diaceturato de diminazeno.

A toxicidade de algumas drogas tripanocidas é outro ponto que deve ser observado. Reações fatais têm ocorrido com a utilização da dose recomendada de diaceturato de diminazeno em equinos, camelos, burros e cães (UILENBERG, 1998). O dimetil sulfato de quinapiramina, que interfere com a síntese de proteína e do DNA, tem sido efetivo contra *T. evansi*, porém é altamente tóxico. Também já foi verificado o aparecimento cepas resistentes (DESQUENES, 2004).

O pequeno número de drogas tripanocidas disponíveis no mercado, a toxicidade de alguns princípios ativos, o desenvolvimento da resistência, aliados ao aparente desinteresse para o desenvolvimento de novas moléculas pelas indústrias farmacêuticas, torna a busca por novas alternativas para o controle das tripanosomoses um assunto de alta relevância.

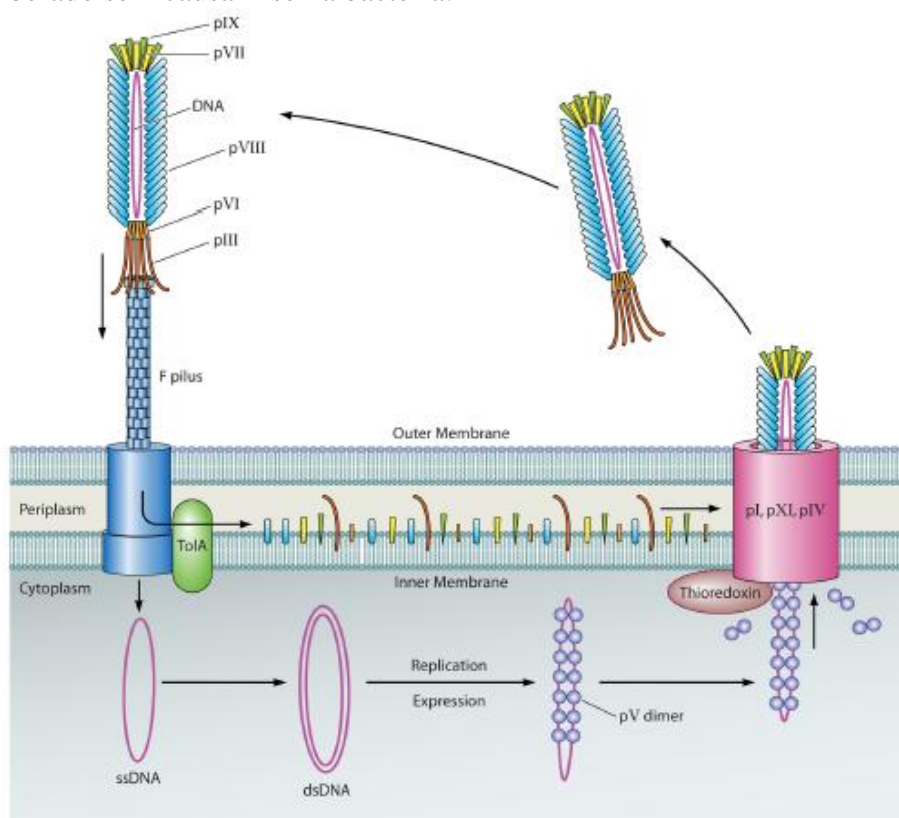
1.1.8 Phage display

A técnica de *phage display* consiste na apresentação de peptídeos ou proteínas exógenas ligadas a proteínas do capsídeo do bacteriófago, tem sido amplamente utilizada para vários estudos de interação de proteínas e de outras moléculas para encontrar novos ligantes. Os fagos contendo a proteína de interesse são produzidos em linhagens de *E. coli* que possuem o *pilus*. O bacteriófago filamentosso M13, utilizado em bibliotecas de *phage display* possui a capacidade de infectar bactérias através do *pilus*, e após a produção de novas cópias virais pela maquinaria da célula, essas são secretadas sem que ocorra a lise da bactéria. O fago consiste em um DNA de simples fita com 6.407 pb e o seu capsídeo é formado por cinco tipos diferentes de proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX). Para a construção das bibliotecas de apresentação de peptídeos e anticorpos, geralmente são utilizadas as proteínas de superfície pIII ou pVIII (SMITH;

PETRENKO, 1997). George P. Smith foi o primeiro a demonstrar que fagos filamentosos poderiam ser utilizados para apresentar proteínas fusionadas a sua superfície, após a clonagem do gene da proteína EcoRI ao gene da proteína PIII do fago M13 (SMITH, 1985).

Esse método permite a produção do fago ligado à proteína para estudos de maneira simples e de baixo custo (Figura 5).

Figura 5 – Esquema do ciclo de replicação de bacteriófagos filamentosos: o fago M13 utiliza a PIII para se ligar ao pilus da *E. coli*, então a proteína TolA despolimeriza o capsídeo protéico do fago. A simples fita (ssDNA) é liberada no citoplasma, convertida a uma dupla fita (dsDNA), replicada e expressada utilizando a maquinaria da célula hospedeira. Os dímeros da proteína pV juntamente com o ssDNA iniciam a produção da partícula viral, então, a pV é substituída pela pVIII no canal formado pelas proteínas pI, pXI, pIV e uma tioredoxina do hospedeiro. Finalmente o fago maduro é liberado sem causar lise na bactéria.



Fonte: Huang et al., (2012).

A técnica de *phage display* constitui um método rápido e barato para a seleção de novos ligantes. As bibliotecas são desenhadas para possuírem uma alta diversidade de peptídeos apresentados na superfície do fago. Essa diversidade é alcançada por meio de técnicas que geram uma alta taxa de mutação aleatória em locais pré-definidos no

gene que está inserido ao fagomídeo. As mutações aleatórias nos códons possibilitam a mudança de aminoácidos na estrutura da proteína mutante, que é apresentada ancorada ao fago através de suas proteínas de superfície. Bibliotecas que apresentam peptídeos ou proteínas podem apresentar uma diversidade de milhões ou bilhões de sequências de nucleotídeos variáveis (MAGDESIAN, 2008).

A identificação do peptídeo ligante é facilitada, pois a molécula apresentada na superfície do fago é produzida a partir da leitura dos códons do inserto ligado ao DNA do fagomídeo. Isto permite a expressão da proteína exógena ligada à proteína de superfície do fago, portanto, a sequência de aminoácidos do peptídeo é obtida através da determinação da sequência de codificação correspondente, inserida no DNA viral (SMITH; PETRENKO, 1997).

A técnica de *phage display* tem ampla utilização, podendo ser usada para estudar interações proteína-proteína, a especificidade de enzimas e inibidores, anticorpos, e como uma ferramenta para encontrar moléculas antigenicamente ativas (epítomos ou mimetopos) (MAGDESIAN, 2008; PANDE et al., 2010). Fagotopos (fagos expressando peptídeos híbridos) também podem ser utilizados para carrear e apresentar mimetopos no hospedeiro, de forma segura, pois não se replicam em eucariontes, são resistentes as condições ambientais, facilitando assim a armazenagem, toleram uma ampla faixa de pH, podendo ser fornecidos via oral e por serem imunógenos não necessitam de adjuvantes (GAO et al., 2010).

Phage display é uma ferramenta poderosa para a seleção de moléculas com afinidade de ligação a diversos tipos de alvos, as moléculas ligantes capturadas a partir de *rounds* de seleção podem ou não possuir alguma atividade fisiológica. Portanto, essa ferramenta pode ser utilizada tanto para a descoberta de moléculas que poderão servir como base para o desenvolvimento de novas drogas ou para a produção de novos marcadores.

Muitos peptídeos existentes na natureza possuem atividade antibiótica e estão presentes em organismos multicelulares como, por exemplo, as defensinas e catelicidinas, grupo de peptídeos antimicrobianos que participam do sistema imune inato de animais (SANG e BLECHA, 2008).

Em estudos com *T. brucei* foi construída uma biblioteca de *phage display* para a apresentação de fragmentos de anticorpos de domínio único (VHH) utilizada contra VSGs de *Trypanosoma brucei brucei*. Após o terceiro *round* de seleção contra VSGs

purificadas, um ligante (cAb-An33) a uma VSG que se apresentou constante (AnTat1.1 com o ácido aspártico ligado a um oligossacarídeo rico em manose - GlnNAc₂-Man₅₋₉), foi selecionado. Testes *in vivo* demonstraram que o cAb-An33 encontrou o alvo na região da bolsa flagelar, onde a camada de VSG principal é menos densa. Com o propósito de testar um novo precursor de agente tripanocida, a enzima β -lactamase foi complexada ao VHH (cAb-An33). Segundo os autores a utilização cAb-An33 / β -lactamase para a produção do PDM (phenylenediamine mustard) à partir da pró-droga CCM [7-(4-carboxibutamido)-cephalosporin] foi promissor (STIJLEMANS et al., 2004). Todavia, apenas a ligação com alta afinidade do pequeno anticorpo (Nanoanticorpo) An33 ao *T. brucei*, também demonstrou ser lítico para o parasito, tanto *in vivo* como *in vitro* (STIJLEMANS et al., 2011).

Com o objetivo de desenvolver novas ferramentas para o tratamento de cepas resistentes de *Trypanosoma brucei rhodesiense*, Baral et al., (2006) modificaram a APOL-I, deletando seu domínio de interação com a proteína associada à resistência do soro (SRA), presente em *T. brucei rhodesiense*, evitando a inibição da APOL-I pela SRA. A proteína truncada foi conjugada ao anticorpo VHH anti-VSG, descoberto por *phage display* (STIJLEMANS et al., 2004), para a produção de uma imunotoxina com atividade tripanocida. A proteína demonstrou ser eficiente no tratamento de ratos infectados com *T. brucei rhodesiense*.

Novas ferramentas de diagnóstico direto e indireto também têm sido pesquisadas e desenvolvidas por meio da técnica de *phage display*, como, por exemplo, mimetopos para estudos sorológicos de *Trypanosoma spp.* Utilizando bibliotecas comerciais de 12 e 7 mers foram encontrados mimetopos ligantes aos anticorpos monoclonais anti-VSGs (LiTat1.3 e LiTat1.5) de *T. brucei gambiense*, produzidos em camundongo. Os peptídeos encontrados com as bibliotecas foram biotinilados e testados com soro positivo de portadores do parasito com sucesso (NIEUWENHOVE et al., 2011).

Os exames diretos muitas vezes são mais indicados para a tomada de decisão, visto que se consegue acessar a necessidade real de tratamentos de pacientes acometidos em determinado momento por *Trypanosoma spp* e que possam continuar albergando o parasito. Com esse objetivo, Obishakin et al., (2014) elaboraram um nanoanticorpo (Nb392) contra *Trypanosoma ssp.* utilizando uma biblioteca de *phage display*. Para a construção da biblioteca, alpacas foram infectadas com o estrato total de *T. evansi* e a biblioteca construída a partir do RNA obtidos de linfócitos do sangue periférico do

animal. A partir de *rounds* usando essa biblioteca de *phage display* contra o *T. evansi* foi encontrado um VHH ligante a proteína conservada paraflagelar Rod (PFR1). O Nb392 foi capaz de reconhecer essa proteína também em *T. brucei*, *T. congolense* e *T. vivax*.

Odongo et al., (2016) desenvolveram um nano anticorpo contra *T. congolense* produzido em alpaca, utilizando uma biblioteca de *Phage Display* construída a partir do RNA de linfócitos do sangue periférico de animais imunizados com o proteoma total de *T. congolense*. Esse nanoanticorpo foi engenhado para a execução de um teste ELISA *sandwich* (Nb474 Histidina / Nb474 Biotina). Após os *rounds* de seleção, o ligante selecionado foi a aldolase glicosomal. A especificidade (94%) e sensibilidade (87%) desse nanoanticorpo para *T. congolense* foram testadas contra 11 amostras de *T. congolense* e amostra de *T. brucei*; *T. evansi* e *T. vivax*.

A busca por novos ligantes com características bioativas ou não, contra *T. evansi*, poderão servir como base para o desenvolvimento de novos marcadores biológicos para a execução de testes diagnósticos práticos e específicos de *T. evansi* ou para o desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento e controle do parasito.

1.1.9 Proteína de Domínio *Kunitz*

As proteínas ligantes geralmente possuem uma seletividade ao alvo, maior do que ligantes sintéticos, devido a sua grande superfície de interação, sendo possível focar modificações na região de interação do esqueleto protéico com o alvo, minimizando as ligações inespecíficas (DIAS e ROQUE, 2017). A ligação ao alvo muitas vezes é feita pelos *loops* expostos da proteína. Esses *loops* ligam as estruturas estáveis da proteína, como por exemplo, folha- β , α -hélice e são susceptíveis a múltiplas substituições de aminoácidos, sem que ocorra a desestabilização da proteína (HOSSE et al., 2006; ZOLLER et al. 2011).

Uma proteína base para um esqueleto deve ser ao mesmo tempo pequena e robusta, com regiões estáveis e outras para serem utilizadas na diversificação, com o objetivo de potencializar a interação, de modo que tais modificações não afetem a estabilidade da proteína. Como vantagens adicionais, devem ser de baixo custo e fácil produção, como por exemplo, em sistemas de expressão em *E. coli*. As proteínas mais

comumente descritas para utilização na engenharia de proteínas ligantes são *Affibody*, *Adnectin*, *DARPin*s, *Monobody*, *Knottin*, *Affitins*, *Kunitz Domain*, *PDZ-domain* ou *Lipocalins* (DIAS e ROQUE, 2017).

Segundo Housse et al., (2006), proteínas ligantes utilizadas como esqueletos para mutagênese e reconhecimento de alvos, podem ser classificadas em três categorias: aqueles que consistem em α -hélice; pequenos esqueletos apresentando uma estrutura irregular secundária com α -hélice e folhas- β e os que possuem predominância de folhas- β . As proteínas inibidoras de Domínio *Kunitz* e Defensinas, pertencem ao segundo grupo.

Williams e Baird (2003) arquitetaram uma biblioteca de *phage display*, utilizando como esqueleto uma lipoproteína humana associada à inibição da coagulação. Essa proteína pertence à família conhecida como inibidoras de Domínio *Kunitz*, são pequenas proteínas irregulares, com aproximadamente 60 aminoácidos, três pontes de dissulfeto, e possuem *loops* aparentes que podem ser mutados sem que ocorra desestabilização estrutural da proteína. Esse esqueleto da biblioteca é uma proteína que está associada à inibição da coagulação. Após *rounds* com a biblioteca foi encontrado um ligante de alta afinidade à calicreína, uma serina protease que age sobre o bradicinogênio, liberando substâncias como bradicinina e kalidina, e possui ação vasodilatadora direta. É importante na patofisiologia do angioedema hereditário. A proteína mutante selecionada, denominada de DX-88, originou o KALBITOR[®] ecallantide, atualmente utilizada para o tratamento da doença.

Zhao et al., (2004) construíram uma biblioteca de *phage display* apresentando a *Defensina A* na proteína de superfície PIII de bacteriófagos filamentosos M13. Trata-se de uma pequena proteína de 29 resíduos (1ICA29), formada por uma alfa-hélice ligada a duas folhas betas por três pontes de dissulfeto e apresentando dois *loops* livres que foram mutagenizados. Essa biblioteca gerou a *Kunitz Domínio anti-TNF* (Creative Biolabs[®]) utilizada para diagnóstico, pesquisa e em algumas aplicações terapêuticas.

As proteínas de Domínio *Kunitz* são importantes para o desenvolvimento de biosensores de alta afinidade que podem gerar novas ferramentas para diversos diagnósticos. Possuem grande resistência enzimática, a um grau elevado de modificações químicas e grande estabilidade térmica (ZOLLER et al. 2011).

Propriedades farmacocinéticas como a rápida acumulação na região de interesse; rápida passagem pelos compartimentos não específicos e por serem moléculas que

mimetizam anticorpos, com a vantagem de serem menos imunogênicas e, portanto, com menor efeito colateral, e finalmente por terem uma produção menos complexa e mais barata, são considerados importantes esqueletos para o desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas e novas terapias (HOSSE et al., 2006; ZOLLER et al. 2011).

Devy et al, (2007) utilizaram uma biblioteca de *phage display* com um esqueleto de Domínio *Kunitz* para a identificação da molécula denominada de DX-1000 que possui alta afinidade à plasmina. Por se tratar de uma proteína de baixa massa molecular (≈ 7 kDa), exibe um rápido *clearance* plasmático. A proteína foi conjugada com o polietilenoglicol (4PEG–DX-1000) para diminuir o *clearance* plasmático, melhorando sua característica para o tratamento de doenças crônicas. O 4PEG–DX-1000 reduziu significativamente o ativador uroquinase do plasminogênio. Testes com a droga em tumores demonstraram a diminuição da expressão do plasminogênio, da vascularização e, por conseguinte da proliferação de tumores, não afetando a homeostasia e a coagulação.

Uma biblioteca de *phage display* construída a partir da BPTI (proteína inibidora da tripsina pancreática bovina), constituída por um esqueleto protéico de 58 aminoácidos, de Domínio *Kunitz*, que se liga com alta afinidade a tripsina bovina e outras serinas (BORJIGIN e NATHAN, 1993) foi utilizada por Roberts et al., (1992) para buscar uma proteína com uma afinidade à Elastase Neutrófila Humana (HNE). Foi encontrado um ligante com atividade biológica maior do que qualquer outro inibidor conhecido para a elastase. Attucci et al. (2006) demonstraram que a proteína de baixo peso molecular (≈ 6 kDa) EPI-hNE4 (depelstat[®]) originado da proteína DX-890, descoberta a partir da biblioteca de *phage display* BPTI é um potencial inibidor da HNE, podendo ser utilizado para controlar eventos de excessiva atividade proteolítica da elastase em pacientes com fibrose cística pulmonar.

A protease APPI (inibidor do precursor da β -proteína), inibidora de uma proteína causadora de amilóide envolvida na doença de Alzheimer, que possui Domínio *Kunitz* (α -hélice, três folhas- β e três *loops*), foi usada para a construção de bibliotecas de *phage display*. As bibliotecas mutagenizadas alcançaram uma variabilidade teórica de $3,2 \times 10^5$ a $3,2 \times 10^6$. Foram utilizadas para encontrar inibidores do complexo Fator tecidual / Fator VIIa (TF-FVIIa), envolvido na cascata da coagulação após dano tecidual. A partir da seleção observaram que o clone TF7I-C possuía 4 diferentes resíduos o que

aumentou seu poder de interação como alvo em mais de 150 vezes, com relação a proteína nativa (APPI) (DENNIS e LAZARUS, 1994).

Pequenos peptídeos ricos em dissulfeto, encontrados na peçonha de predadores, possuem como alvo canais de transporte de Na, K, Ca e Cl, presente na membrana celular (KUMAR et al., 2011). Essas proteínas são denominadas de proteínas de Domínio *Kunitz* e estão presentes em toxinas do veneno de escorpião, formam pequenas estruturas ligadas por pontes de dissulfeto muito estáveis que permitem a exposição de *loops*, necessários para interagir com cavidades (BINZ et al., 2005). A toxina de escorpião consiste em uma pequena proteína, formada por α -hélice, folhas- β e *loops*, é estabilizada por três pontes de dissulfeto. Tratando-se de uma proteína compacta, bem organizada e estável, ideal para ser utilizada na engenharia de proteínas ligantes que podem ou não possuir atividade biológica (VITA et al., 1995).

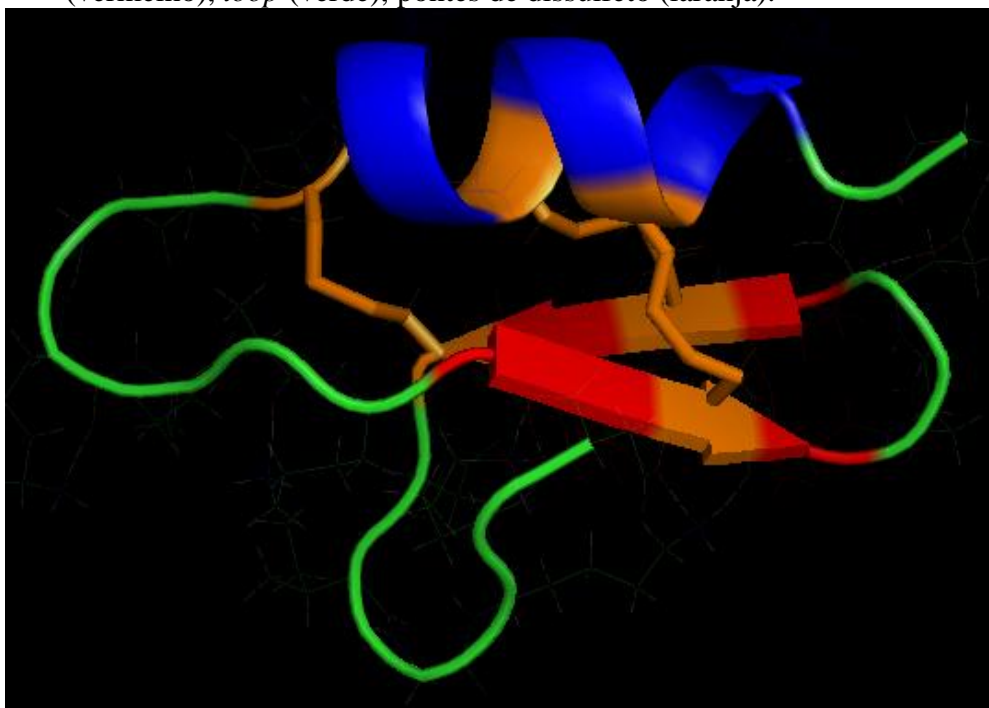
Martin et al., (2003) construíram um peptídeo mini-CD4 para mimetizar o alvo da gp120 do vírus HIV no linfócitos CD4, o vírus utiliza a glicoproteína para se ligar e infectar a célula hospedeira. Com o intuito de estudar a interação e procurar desenvolver novas ferramentas para a profilaxia, foi sintetizado o CD4M33, utilizando o esqueleto da toxina charybdotoxin do veneno do escorpião *Leiurus quinquestriatus hebraeus* com uma alteração em uma folha- β para mimetizar o *loop* do CDR2 que interage com a GP 120. Huang et al., (2005) construíram outro peptídeo a partir do esqueleto da toxina charybdotoxin, o F23, contendo o bifenil na cadeia lateral do resíduo 23, também obtiveram sucesso na alta afinidade com a gp120. Os autores estudaram as interações da gp120 com os peptídeos CD4M33 e F23 e encontraram uma maior eficiência de interação entre esse último peptídeo e a gp120. Ambos os peptídeos constituem importantes ferramentas, podendo, a partir destes, serem desenvolvidas novas vacinas e novos bloqueadores da infecção.

O esqueleto proteico escolhido para a construção da nossa biblioteca foi descrito por Dhawan et al (2003). Trata-se da toxina BTK-2 do escorpião vermelho da espécie *Mesobuthus tamulus* (Figura 6) que possui alta similaridade (40 a 70%) com outras toxinas de escorpião da família α -KTx. O peptídeo BTK-2 tem baixa massa molecular ($\approx 3,5$ kDa) e carga positiva, é formado por 32 aminoácidos e possui uma estrutura formada por duas folhas- β , uma α -hélice e dois *loops*. Esse esqueleto torna-se rígido pela presença de seis cisteínas que formam entre si três ligações dissulfeto. Essa toxina tem afinidade por canais de potássio hKv1.1, bloqueando fisicamente o poro do canal de

K. Acredita-se que a presença da prolina na região da α -hélice e a maior exposição do resíduo de lisina na posição 25 (folha- β) são os principais fatores que aumentam a interação com canais de K em relação a outras toxinas da família α -KTx, ocasionando o bloqueio dos impulsos.

O BTK-2 difere de outros inibidores protéicos de canais de K por não apresentarem resíduos aromáticos na sua estrutura. A afinidade do BTK-2 com o canal de K não é dependente da carga da proteína, é uma ligação apenas estrutural (KUMAR et al., 2011).

Figura 6 – Estrutura da toxina BTK-2 (*Mesobuthus tamulus*): α -hélice (azul), folha- β (vermelho), *loop* (verde), pontes de dissulfeto (laranja).



Fonte: Produzido pelo autor utilizando a ferramenta PyMol®, 2017.

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente os testes diagnósticos das tripanosomoses que acometem animais possuem alguns revezes no que diz respeito à especificidade, portanto, a busca de um marcador específico contra *T. evansi* que poderá ser utilizado no desenvolvimento de novos testes para a identificação específica do parasito de modo preciso e acessível, constitui uma importante ferramenta para auxiliar no diagnóstico, tratamento, controle e estudos epidemiológicos do *T. evansi*. Somado a isso, a procura de peptídeos antimicrobianos ou inibidores de infecções por *T. evansi* representa uma estratégia em potencial no controle e prevenção da “surra”. De uma maneira geral, peptídeos antimicrobianos apresentam características em comum, como por exemplo, natureza catiônica e caráter anfipático que permitem sua ligação nas superfícies celulares carregadas negativamente. Os peptídeos antimicrobianos atuam pela formação de poros e aumento de permeabilidade celular, porém, o mecanismo específico pelo qual esses peptídeos causam a morte celular ainda não foi completamente elucidado.

A técnica de apresentação por fagos (*phage display*) tem sido amplamente utilizada para a descoberta de peptídeos específicos contra os mais diversos alvos, desde receptores celulares, enzimas e anticorpos. A técnica utiliza uma metodologia onde bacteriófagos são modificados por biologia molecular, e pequenos peptídeos são fusionados a uma das proteínas de superfície de fagos filamentosos. Devido ao fato do peptídeo fusionado à proteína de membrana poder ser submetido à randomização por técnicas de mutagênese direcionadas do seu respectivo gene, é possível a construção de biblioteca de peptídeos diversificados, onde cada partícula viral apresenta um único polipeptídeo exógeno distinto na superfície de cada fago. Com isto, podem ser apresentadas contra um determinado alvo, bilhões de proteínas modificadas a partir de um esqueleto protéico.

3. HIPÓTESE

Serão identificadas moléculas peptídicas ligantes ao *T. evansi*, as quais poderão ser utilizadas como marcadores e assim contribuir para o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico e poderão servir como base para o estudo e desenvolvimento de drogas para o tratamento da “surra”.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo da pesquisa foi encontrar um ligante específico de alta afinidade contra o *T. evansi* que possua ou não atividade fisiológica contra o parasito. Podendo ser simplesmente utilizado como marcador em testes de diagnóstico direto ou para o desenvolvimento de uma nova droga tripanocida. Com o propósito de alcançar esse objetivo, construímos uma biblioteca de *phage display* utilizando como esqueleto peptídico a estrutura da proteína de Domínio *Kunitz* do veneno do escorpião *Mesobuthus tamulus*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 – Construção e validação de uma biblioteca sintética de proteínas derivada da proteína de Domínio *Kunitz* da toxina do escorpião *Mesobuthus tamulus* no formato de apresentação por fago.
- 2 – Seleção de proteínas sintéticas ligantes ao *T. evansi*.
- 3 – Teste qualitativo para a caracterização da capacidade de ligação específica.
- 4 – Teste qualitativo de toxicidade para o *T. evansi* das proteínas isoladas.

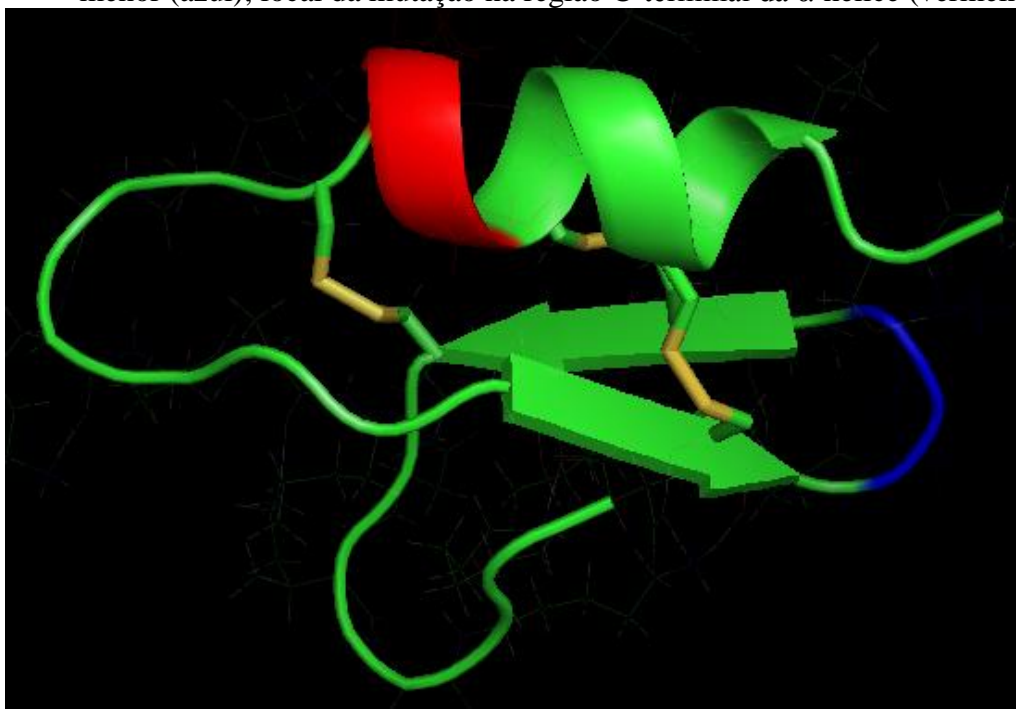
5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE *PHAGE DISPLAY* COM A PROTEÍNA DE DOMÍNIO *KUNITZ*

A construção da biblioteca APIII6-PJH3 foi baseada em uma pequena proteína, de Domínio *Kunitz* (BTK-2), presente na toxina com afinidade a canais de K, encontrada no veneno do escorpião *Mesobuthus tamulus*. Apresenta uma α -hélice fixada a duas folhas- β por três pontes dissulfeto que conferem uma estrutura tridimensional de alta estabilidade conformacional e permite múltiplas substituições de aminoácidos, ideal para a técnica de mutagênese. Segundo Zoller et al. (2011) a utilização de proteínas com essas características como esqueleto para a construção de bibliotecas possuem muitas vantagens, como por exemplo, resistência enzimática, a grandes modificações químicas no meio e quando utilizadas *in vivo* são rapidamente acumuláveis na região de interesse e depuradas de compartimentos não específicos; são miméticas aos anticorpos, porém, mais facilmente produzidas e menos imunogênicas.

Após a inclusão do inserto do DNA do gene da proteína BTK-2 no fagomídeo, o esqueleto será mutagenizado em dois locais, na porção C-terminal da α -hélice e no *loop* menor (Figura 7).

Figura 7 – Estrutura da toxina BTK-2 (*Mesobuthus tamulus*): local da mutação no *loop* menor (azul); local da mutação na região C-terminal da α -hélice (vermelho).



Fonte: Produzido pelo autor utilizando a ferramenta PyMol[®], 2017.

5.1.1 Construção da biblioteca de *phage display* utilizando como esqueleto a proteína de Domínio *Kunitz* BTK-2.

Para a construção do gene da proteína de Domínio *kunitz* foram inicialmente desenhados 5 oligonucleotídeos (Tabela 1) e sintetizados pela empresa *Integrated DNA Technologies*[®] (IDT[®]). Na concepção dos iniciadores também foram inseridas regiões de restrição para as enzimas *Sall* e *HindIII* nos oligonucleotídeos 1 e 5, respectivamente.

Tabela 1 – Iniciadores utilizados no anelamento em sobreposição (regiões em vermelho) para a montagem do gene da BTK-2. Em destaque (sublinhado) os sítios de restrição das enzimas *SalI* (P1) e *HindIII* (P5).

INICIADOR	SEQUÊNCIAS
P1	5'-GA <u>AGCT</u> TTTCTGGTGGTGGTCTGTGGGTTGCGCAGCA-3'
P2	5'- <u>CCCAACGCGTCGT</u> ACGTGCTCCTCCACGCGTCCATC-3'
P3	5'-AGGTGCGCAGGTAGGGCAGCACCGACGTGCGAAAAC-3'
P4	5'-GCTGCACGCTTTTGCTTCACACGTTTACGTTGTTT-3'
P5	5'-CACGTTTACGTTGTAACCATTTTTTCTAC <u>AGCT</u> GCCC-3'

Fonte: produzido pelo autor, 2017.

Esses iniciadores foram utilizados em uma reação de anelamento em que as regiões complementares, foram sobrepostas para a construção do gene completo da BTK-2 (Tabela 2).

Tabela 2 – Sequência da BTK-2_{mut} depois da sobreposição dos iniciadores. Em destaque (sublinhado) os sítios de restrição das enzimas *SalI* e *HindIII*, respectivamente.

SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA BTK-2 _{mut}
GA <u>AGCT</u> TTTCTGGTGGTGGTCTGTGGGTTGCGCAGCATGCACGAGGAGGTG CGCAGGTAGGGCAGCACCGACGTGCGAAAACGAAGTGTGCAAATGCAACA AAGGTAAAAAAGATGT <u>CGAC</u> GCGG

Fonte: produzido pelo autor, 2017.

Por se tratar de uma toxina, os iniciadores foram desenhados para a construção do esqueleto que será utilizado na biblioteca, com algumas mutações na α -hélice, em relação à BTK-2. Portanto, os aminoácidos valina (V)₃, glicina (G)₄, alanina (A)₆, glutamina (E)₇, prolina (P)₉, metionina (M)₁₀ e histidina (H)₁₁ da α -hélice foram substituídas por argininas (Tabela 3) para a construção do esqueleto protéico de Domínio *Kunitz* mutante (BTK-2_{mut}).

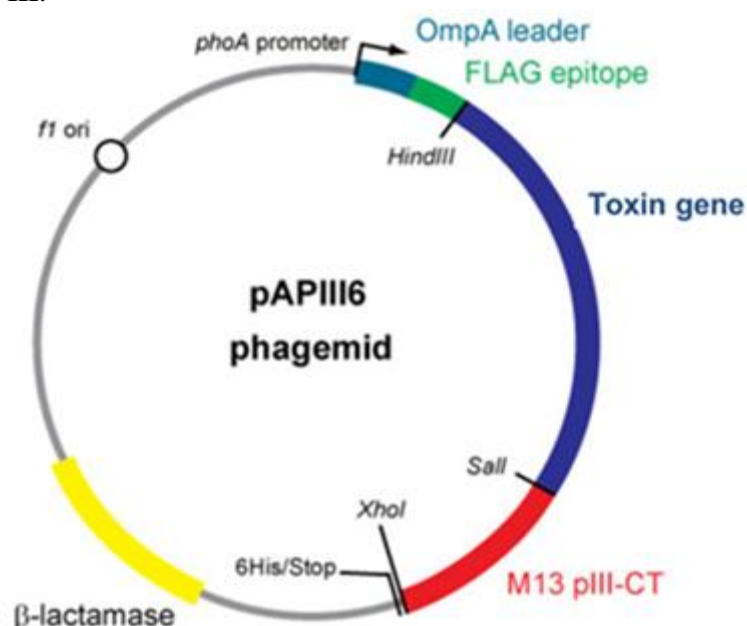
Tabela 3 – Substituições dos aminoácidos valina, glicina, alanina, glutamina, prolina, metionina e histidina (sublinhado) da α -hélice da BTK-2 por argininas (sublinhado) na BTK-2 mut .

DESIGNAÇÃO	SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS
BTK-2	GS <u>V</u> GCA <u>E</u> C <u>P</u> MHCKGKAKPTCENEVCKCNIGKKD
BTK-2 mut	GS <u>R</u> R <u>C</u> R <u>R</u> CRRRCKGKAKPTCENEVCKCNIGKKD

Fonte: produzido pelo autor, 2017.

As regiões de restrição para as enzimas *Sall* e *HindIII* do fagomídeo pAPIII6 (Figura 8), vetor derivado do pCANTAB5E, estão localizadas após o gene do epítipo FLAG e antes da proteína PIII, respectivamente, sendo o local para a ligação do gene BTK-2 mut (DA SILVA et al., 2010). O gene exógeno será expresso junto à porção C-terminal da proteína PIII do fago (SMITH e PETRENKO, 1997).

Figura 8 – Mapa do vetor fagomídeo APIII6: o gene da proteína de Domínio *Kunitz* BTK-2 mut com as regiões de restrição *HindIII* e *Sall* foi clonado no vetor, resultando em um gene quimérico com o OmpA N-terminal (sequência de exportação), o epítipo FLAG (para imunodeteção) e a porção C-terminal da PIII.



Fonte: adaptado de Da Silva et al., (2010).

5.1.2 Reação de sobreposição dos oligonucleotídeos para a construção do gene da BTK-2mut.

A reação para a construção do gene da toxina foi elaborada semelhante a uma reação da cadeia da polimerase (PCR), porém, sem a presença de um DNA molde. Inicialmente foi montada uma reação utilizando 0,2 mM de cada um dos oligonucleotídeos P1, P2, P3 e P4; 0,4 mM de dntp; 1U de PFU DNA polimerase (produzida em nosso laboratório) e 1 x de tampão de reação (tampão de reação 10x = 200 mM Tris-HCl pH 8,8; 100 mM KCl; 100 mM (NH₄)₂SO₄; 20 mM MgSO₄, 1 % Triton[®] X-100 e 1 mg / mL BSA). Para a reação foram utilizadas as seguintes condições: um ciclo de 95 °C por 1 min; 20 ciclos de 94 °C por 30 seg, 50 °C por 30 seg e 72 °C por 1 min e um ciclo de 72 °C por 5 min. Uma alíquota da reação com GelRed[®] (Biotium[®]) foi aplicada em um gel de agarose 1 % e verificou-se que ocorreu a produção de um fragmento menor que 100 pb.

O restante da reação anterior foi purificado utilizando o kit HiYield[®] DNA gel/PCR *Extraction Kit* (Real Biotech Corporation[®]), conforme instruções do fabricante. Uma segunda reação, agora utilizando o DNA obtido da purificação em coluna, juntamente com os oligonucleotídeos P1 e P5; 0,4 mM de dntp; 1U de HotStar[®] DNA polimerase (QUIAGEN[®]); 1 x de tampão (Tris-HCl pH 8,7; KCl; (NH₄)₂SO₄) e 1,5 mM de MgCl₂, foi elaborada para finalizar a montagem do gene. Nesta reação utilizou-se uma Taq DNA polimerase para a extensão do restante do gene e para inserir adenosinas à extremidade 3' do gene completo, possibilitando a inserção deste no vetor de clonagem pGEM-T Easy[®]. Foram utilizadas as seguintes condições para a reação: um ciclo de 95 °C por 1 min; 20 ciclos de 94 °C por 30 seg, 50 °C por 30 seg e 72 °C por 1 min e finalmente 72 °C por 5 min. Uma alíquota da reação com GelRed[®] (Biotium[®]) foi aplicada em um gel de agarose 1 %, possibilitando a visualização de um fragmento maior que 100 pb (gene da BTK-2mut possui 125pb). Para ambas as reações descritas anteriormente foi utilizado um termociclador da marca BIOCYCLER[®].

Em seguida o gene produzido foi purificado da reação, utilizando o kit HiYield[®] DNA gel/PCR *Extraction Kit* (Real Biotech Corporation[®]), conforme instruções do fabricante e clonado no sistema pGEM-T Easy[®] (PROMEGA[®]) com o propósito de amplificar o número de cópias do gene da proteína de Domínio Kunitz BKT-2mut para então cloná-lo no fagomídeo pAPIII6.

5.1.3 Clonagem do gene BTK-2mut no pGEM-T Easy® e transformação em DH10B

Para a reação de clonagem no sistema pGEM-T Easy® foram utilizados 179,2 ng do gene da toxina kunitz; 1 x *Rapid Ligation Buffer*; 50 ng do pGEM-T Easy® e 1 U da enzima T4 DNA ligase. A ligação foi submetida a 16 °C durante 1 h e mantida a 4 °C, durante a noite toda.

Finalmente 5 µL da reação de ligação em pGEM-T Easy® (Promega) juntamente com 50 µL de *Escherichia coli* da linhagem DH10B, cálcio-competente, foram adicionados em um microtubo de 1,5 mL. A seguir, para a transformação, a ligação foi submetida a um choque térmico, primeiramente o tubo foi incubado por 30 min em gelo, após foi submetido a 42 °C por 45 seg e novamente mantido em gelo por 90 seg. Depois, adicionou-se 300 µL de meio SOC (0,5 % de extrato de levedura; 2 % de triptona; 0,05 % de NaCl; 0,02 % KCl equilibrar o pH em 7,0; autoclavar e adicionar 0,5 % de uma solução a 2 M de MgCl₂ e 2 % de uma solução de glicose 1 M filtrada) e o tubo foi incubado a 37 °C sob agitação de 200 rpm durante 1 h. Após a incubação, 200 µL da transformação foi plaqueada em meio sólido LB / Amp. (1 % de triptona, 0,5 % de extrato de levedura, 1 % de NaCl; 2 % de Agar e 100 µg / mL de ampicilina), Xgal e IPTG para a seleção de clones do plasmídeo contendo o inserto, identificados por meio da formação de colônias azuis (sem o inserto) ou brancas (com o inserto). As placas foram incubadas a 37 °C, durante a noite toda. A confirmação da inserção do gene da BTK-2mut no plasmídeo foi efetuada primeiramente pela PCR de colônias, utilizando como iniciadores os oligonucleotídeos P1 e P5 para a reação. Foi escolhida uma colônia positiva na PCR, a amostra 8, que em seguida foi inoculada em 50 mL de meio LB / Amp. (1 % de triptona, 0,5 % de extrato de levedura, 1 % de NaCl e 100 µg / mL de ampicilina) e incubada a 37 °C, 200 rpm, durante a noite toda. No dia seguinte, o cultivo foi transferido para um tubo cônico de 50 mL, centrifugado a 3.500 g, por 15 min, a 4 °C, o sobrenadante descartado e o precipitado utilizado para a extração do DNA plasmidial com o PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen®) conforme instruções do fabricante.

Antes de começarmos a clonagem no fagomídeo, verificamos novamente a presença do gene da BTK-2mut no pGEM-T Easy® (Promega), para isso, foram elaboradas reações da PCR utilizando várias combinações dos iniciadores utilizados na montagem do gene da BTK-2mut (P1/P5; P1/P4 e P2/P4) com o objetivo de analisar os

tamanhos dos fragmentos gerados. Após a PCR, alíquotas das reações com GelRed® (Biotium®) foram aplicadas em um gel de agarose 1 %.

5.1.4 Reação de digestão do clone 8 e do fagomídeo PJH3 WT D5 (vetor pAPIII6)

O gene da BTK-2*mut* ligado ao vetor de clonagem pGEM-T Easy® (Promega), foi utilizado para a clonagem no fagomídeo PJH3 WT D5, vetor pAPIII6 que carrega o gene do fragmento do anticorpo ScFv D5 (Anti HIV gp41) (DA SILVA et al., 2010).

Inicialmente foi feita uma digestão do clone 8 para liberar do vetor de clonagem o gene BTK-2*mut*, e do fagomídeo o gene do anticorpo D5 para então ligar, o vetor pAPIII6 ao gene da BTK-2*mut*. Para a digestão do fagomídeo pAPIII6 e liberação do gene ScFv D5 foram utilizadas as enzimas *Sall* (20 U), *HindIII* (20 U) e 1x do tampão CutSmart® (50 mM de Acetato de potássio, 20 mM de Tris-acetato, 10 mM de Acetato de magnésio e 100 µg / mL de BSA; pH 7,9), todos produzidos pela *New England Biolabs Inc.*, juntamente com 855 ng do DNA plasmidial do pAPIII6. Na reação de digestão do vetor de clonagem para a liberação do gene da toxina foram utilizadas as enzimas *Sall* (30 U), *HindIII* (30 U) e 1x do tampão CutSmart®, juntamente com 12,7 µg do DNA plasmidial do clone 8. As reações de digestão foram mantidas a 37 °C durante 8 h. Após, as reações foram aplicadas em géis de agarose com GelRed® (Biotium®), para a visualização dos fragmentos. A digestão do fagomídeo foi aplicada em um gel de agarose 1 % e o fragmento de aproximadamente 4.160 pb, correspondente ao pAPIII6, foi excisado do gel. Enquanto que o vetor de clonagem foi aplicado em um gel de 4 % para uma melhor separação da digestão e o fragmento de aproximadamente 125 pb, correspondente ao gene da toxina kunitz BTK-2, foi excisado do gel.

Para a recuperação do DNA digerido do gel de agarose foi utilizado o HiYield® DNA gel/PCR *Extraction Kit* (Real Biotech Corporation®), conforme instruções do fabricante.

5.1.5 Reação de ligação do gene da BTK-2mut no fagomídeo pAPIII6

Com o objetivo de inserir o gene da BTK-2mut no fagomídeo para a posterior montagem do fago para a expressão da proteína de Domínio *Kunitz* ancorada a proteína PIII de superfície do fago, foram montadas as reações utilizando a enzima T4 DNA ligase e o tampão de reação 10x (300 mM Tris-HCl, pH 7.8; 100 mM MgCl₂; 100 mM DTT e 10 mM ATP) ambos da empresa Promega[®], ATP (Thermo Fisher Scientific[®]), o fagomídeo pAPIII6 (4.160 pb) e o gene da BTK-2mut (125 pb) em uma proporção molar de 1:0, 1:1 e 1:6 (vetor : inserto), conforme a figura 9.

Figura 9 – Reações de ligação do gene da BTK-2mut ao vetor pAPIII6.

Componentes da Reação	Razão molar de ligação Vetor : Inserto		
	1:0	1:1	1:6
pAPIII6	15 µL (34,5 ng)	15 µL (34,5 ng)	15 µL (34,5 ng)
GENE BTK-2mut	0	1 µL (1,4 ng)	4,6 µL (6,47 ng)
LIGASE	1,5 µL (1-3 U/µL)	1,5 µL (1-3 U/µL)	1,5 µL (1-3 U/µL)
ATP	1 µL (20 mM)	1 µL (20 mM)	1 µL (20 mM)
TAMPÃO	2 µL	2 µL	2,5 µL
H ₂ O	1 µL	0	0
TOTAL	20,5 µL	20,5 µL	24,6 µL

Fonte: produzido pelo autor, 2017.

As ligações foram incubadas a 16 °C durante 1 h e em seguida mantidas a 4 °C durante a noite toda, para então serem transformadas em *E. coli* da linhagem XL1B.

5.1.6 Transformação da ligação em *E. coli* linhagem XL1B eletrocompetente

O controle 1:0 e as ligações 1:1 e 1:6 foram transformadas em *E. coli* da linhagem XL1Blue eletrocompetentes, para as transformações foram utilizados 10 µL

de cada ligação em alíquotas de 100 µL de XL1Blue, as células eletrocompetentes foram descongeladas em gelo e após a adição da ligação, a mistura foi homogeneizada e colocada em uma cuvetta de 0,2 cm, em gelo, depois foi aplicada uma descarga de 2.500V, adicionado 500 µL de meio SOC, pré-aquecido a 37°C e incubado por 1 h a 200 rpm. Após o meio foi concentrado por centrifugação a 1.500g durante 5 min. e plaqueado em LB / Amp e incubado a 37 °C, durante a noite toda.

As placas com os crescimentos provenientes das ligações 1:1 e 1:6 apresentaram colônias. Dezesesseis colônias da placa 1:6 foram testadas em uma reação da PCR, utilizando os oligonucleotídeos P1 e P5 usados na construção do gene da BTK-2*mut*, como *primers*. A PCR de colônia foi montada conforme segue: uma porção da colônia em 0,5 µL de H₂O; 0,2 mM dos oligonucleotídeos P1 e P5; 0,4 mM de dntp; 1U de PFU DNA polimerase (produzida em nosso laboratório); 1 x de tampão de reação (20 mM Tris-HCl pH 8,8; 10 mM KCl; 10 mM (NH₄)₂SO₄; 2 mM MgSO₄, 0,1 % Triton[®] X-100 e 0,1 mg / ml BSA); e H₂O para completar 50 µL. A PCR foi realizada em um termociclador da marca BIOCYCLER[®] com as seguintes condições: desnaturação inicial (95 °C por 1 min.); 20 ciclos de desnaturação (94 °C por 30 seg.), anelamento (50 °C por 30 seg.) e extensão (72 °C por 1 min.), e extensão final (72 °C por 5 min). Alíquotas das reações com GelRed[®] (Biotium[®]) foram aplicadas em um gel de agarose 1 % para a triagem das colônias positivas.

A colônia, denominada colônia dois, positiva na PCR, foi inoculada em 50 mL de meio LB / Amp. e incubada a 37 °C, 200 rpm, durante a noite toda. No dia seguinte, o cultivo foi transferido para um tubo cônico de 50 mL, centrifugado a 3.500 g, por 15 min., a 4 °C, o sobrenadante descartado e o precipitado utilizado para a extração do DNA plasmidial com o PureLink[®] Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen[®]), conforme instruções do fabricante. Após a extração, a amostra 2 foi preparada para o sequenciamento com 4,5 picomol do *primer* pAPIII6 F (5' TTGCGCAAGCTGACTACAAG 3'), 213 ng do DNA plasmidial obtido da amostra e H₂O para completar 6 µL. Em seguida a amostra foi seca em *Speed-vac* Eppendorf[®] a 45 °C durante 20min. e enviada para a empresa ACTGene Análises Moleculares LTDA para sequenciamento.

5.1.6.1 Produção de *E. coli* linhagem XL1Blue eletrocompetente.

A ligação entre o vetor pAPIII6 e o gene da BTK-2*mut* foi transformada em XL1Blue, para isso foram produzidas células eletrocompetentes, utilizando o protocolo adaptado de Barbas III et.al. (2001) conforme segue:

No primeiro dia foi semeada uma placa de LB / Tet. (1 % de tripton; 0,5 % de extrato de levedura; 1 % de NaCl; 2 % de Agar e 10 µg / mL de tetraciclina) com o estoque em glicerol da linhagem XL1Blue de *E. coli* e incubada a 37 °C, durante a noite toda.

No dia seguinte uma colônia de XL1Blue foi inoculada em 15 mL de meio SB / Tet. (3 % de peptona de caseína; 2 % de extrato de levedura; e 1 % de MOPS, pH 7 com 20 µg / mL de tetraciclina) e incubado a 37°C com agitação a 200 rpm durante a noite toda.

Foram preparados três erlenmeyer (500 mL), cada um contendo 100 mL de meio SB (3 % de peptona de caseína; 2 % de extrato de levedura; e 1 % de MOPS, pH 7), 2 mL de glicose (20%) e 1 mL de MgCl₂ (1M). Cada frasco foi inoculado com 0,5 mL do crescimento do dia anterior e incubado a 37°C, 250 rpm até alcançar a D.O.₆₀₀ = 0,7. Então, os cultivos foram resfriados em gelo por 15 min. e transferido para seis tubos cônicos de 50 mL e a cultura foi centrifugada a 3.000 g por 20 min. a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e os precipitados re-suspensos em 2,5 mL de glicerol 10%, cada três precipitados foram reunidos em um tubo. Os dois tubos contendo o crescimento foram completados com glicerol 10% e centrifugados a 3.000 g por 20 min. a 4 °C e o sobrenadante descartado, uma nova lavagem e centrifugação conforme descrito anteriormente foi efetuada.

Em seguida cada precipitado foi re-suspenso até completar 25 mL e unidos em um tubo, homogeneizado, centrifugados a 2.500g, 4°C por 15 min. e o sobrenadante foi descartado. Então, o precipitado foi re-suspenso em 3 mL de glicerol 10 % e distribuído em alíquotas de 100 µL em microtubos de 1,5 mL, congeladas em nitrogênio e armazenados a -80 °C.

5.1.6.2 Teste de competência da *E. coli* linhagem XL1B

Para testar a eficiência das *E. coli* da linhagem XL1Blue eletrocompetentes, uma alíquota foi descongeladas em gelo por 10 min., adicionado 1 μ L de PUC 19 *control* DNA (10 pg / μ L) (Invitrogen®) em 50 μ L de XL1Blue, homogeneizado e mantido em gelo, em seguida a amostra foi transferida para uma cuveta de eletroporação de 0,2 cm e aplicada uma descarga de 2.500V, e adicionado 1 mL de meio SOC. O cultivo foi transferido para um tubo cônico de 15 mL, adicionado 2 mL de SOC e incubado a 37°C por 1 h a 250 rpm.

Em seguida foram adicionados 7 mL de meio SB no cultivo, plaqueados 1 μ L, 10 μ L e 100 μ L em LB / Amp e incubado a 37 °C, durante a noite toda.

5.1.7 Montagem do fago a partir do fagomídeo pAPIIK2 (gene da BTK-2*mut* com o vetor pAPII6).

Para a construção da biblioteca, foram montados fagos monoclonais expressando a proteína de Domínio *Kunitz* BTK-2*mut* ligada à proteína PIII do fagomídeo pAPII6 (pAPIIK2). Os fagos foram produzidos a partir da eletroporação do fagomídeo em *E. coli* da linhagem XL1Blue, co-infectadas com o *helper phage* para a montagem de vírions expressando o peptídeo BTK-2*mut*, conforme segue:

Inicialmente 5 μ L do pAPIIK2 foi transformado em 100 μ L de XL1Blue. As células eletrocompetentes foram descongeladas em gelo por 10 min. e após a adição do pAPIIK2 a mistura foi homogeneizada e transferida para uma cuveta de 0,2 cm, em seguida, foi aplicada uma carga de 2.500V, adicionado 500 μ L de meio SOC, pré-aquecido a 37°C e incubado por 1h a 200 rpm para então ser concentrado por centrifugação a 1.500 g durante 5 min, plaqueado em LB / Amp e incubado a 37 °C, durante a noite toda.

No dia seguinte uma colônia de XL1Blue foi selecionada, colocada em 1 mL de meio LB com 30 μ g / mL de ampicilina, 15 μ g / mL de tetraciclina e incubado a 37°C, 200 rpm, durante 1h, em seguida foi adicionado 45 μ g / mL de ampicilina e incubado por mais 1h. Após, o cultivo foi infectado com 2×10^{10} fagos / mL de *helper phage*,

transferido para um erlenmeyer de 250 mL, contendo 40 mL de LB, 50 µg / mL de ampicilina e 10 µg / mL de tetraciclina e incubado a 37 °C, 200 rpm, durante 1h.

Em seguida, foram adicionados 45 µg / mL de kanamicina ao cultivo e incubado a 37°C, 200 rpm, durante a noite toda.

No dia seguinte o meio foi transferido para um tubo cônico de 50 mL e centrifugado a 3500 g, 4 °C por 15 min. O sobrenadante foi transferido para um tubo cônico de 50 mL, contendo 3 % de NaCl e 4 % de PEG 8000, mantido durante 5 min. a 37°C, 200 rpm para solubilização dos sólidos, em seguida, foi incubado em gelo durante 1 h para precipitação. Após a precipitação o tubo foi centrifugado a 15.000 g durante 10 min., o sobrenadante descartado, a boca do tubo seca com papel toalha e o tubo mantido invertido, em temperatura ambiente para a secagem, durante 10min.

Finalmente o fago foi re-suspenso em 500 µL de tampão PBT (PBS pH 7,4; 0,5 % de BSA; 0,05 % de Tween 20), transferido para um microtubo de 1,5 mL e centrifugado a 15.000 g, 4°C durante 5min. para a remoção de partículas sólidas. Após, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo de 1,5 mL, adicionado 5% de glicerol e armazenado a -80°C.

5.1.7.1 Produção do helper phage (M13KO7)

Na técnica de *phage display*, a partícula viral denominada de *helper phage* é utilizada para co-infectar a linhagem de *E. coli* XL1B, após a transformação com o fagomídeo, enquanto esse é responsável por expressar a PIII o *helper phage* fornece o restante dos genes necessários para a produção das outras proteínas virais necessárias para o empacotamento de novos vírions (SMITH e PETRENKO, 1997).

Para a produção do *helper phage*, foi utilizado o protocolo adaptado de Clark (2002), conforme segue. No primeiro dia foi semeada uma placa de LB / Tet. com o estoque em glicerol da linhagem XL1B de *E. coli* e incubada a 37 °C durante a noite toda. No dia seguinte, foram inoculados 30 mL de meio 2YT / Tet (1 % de extrato de levedura; 1,6 % de triptona e 0,5 % de NaCl; pH 7, e 10 µg / mL de tetraciclina) utilizando uma colônia crescida na placa de LB / Tet e incubado a 37 °C, 200 rpm, durante a noite toda. No terceiro dia foram inoculados dois erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de 2YT / Tet, cada um com 2 mL do cultivo do dia anterior e

incubados a 37 °C, 200 rpm por 2 h. Em seguida foi adicionado 100 µL de *helper phage* M13KO7 (1×10^{11} pfu / mL) NEB® e incubado a 37 °C, 200 rpm por 1 h. Após, foi adicionado kanamicina em uma concentração de 70 µg / mL e incubado por mais 4 h nas mesmas condições. Então, a cultura foi centrifugada a 2.500 g por 15 min., o sobrenadante transferido para um tubo cônico de 50 mL, adicionado 7 % de dimethylsulfóxido (DMSO) e armazenado em alíquotas de 1 mL a -80°C.

5.1.7.1.1 Titulação do *helper phage* (M13KO7)

Para conhecer a quantidade de *helper phage* produzidos, procedeu-se com a titulação dos fagos, inicialmente foi feita a diluição do *helper phage* (10^{-1} a 10^{-10}) em meio 2YT. Um ernlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de 2YT / Tet. foi inoculado com uma colônia de XL1B, incubado a 37°C, 200 rpm até alcançar a fase log ($DO_{600} = 0,6$). Após, 1 µL de cada diluição foi transferido para um tubo contendo 100 µL do cultivo, misturado à 3 mL de Top Agar (1 % de triptona, 0,5 % de extrato de levedura, 1 % de NaCl e 0,6% de agarose) e distribuído sobre placas de LB Agar pré-aquecidos a 37 °C. As placas foram incubadas a 37°C, durante a noite toda. No dia seguinte as Unidades Formadoras de Placas (UFP) foram quantificadas.

5.1.7.2 SDS-PAGE do fago contendo o gene da BTK-2mut

Com o objetivo de verificar se após a co-infecção de *E. coli*, linhagem XL1Blue com o fagomídeo pAPIIK2 e o *helper phage* (M13KO7) seria visualizada uma proteína com tamanho equivalente a pIII truncada juntamente com a com a proteína BTK-2mut, ancorada a proteína PIII na superfície do fago, foi utilizada a técnica de SDS-PAGE.

Sendo assim, 20 µL das amostras do fago com a BTK-2mut, fago com o ScFv-D5 e o *helper phage* foram aplicadas em um gel de poliacrilamida a 12 % (3,35 mL de água milli-Q®; 4,05 mL bis-acrilamida 30%; 2,5 mL de Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8; 100 µL SDS 10 %, 100 µL de persulfato de amônio e 30 µL de Tetrametiletilenediamina – Sigma Aldrich®). A eletroforese do gel de poliacrilamida foi executada nas seguintes condições: 150 V, 300 mA, 12 W durante 3h e 30 min.

Após a eletroforese, o gel foi revelado pelo método de coloração Comassie Blue (0,1 % de comassie brilliant blue R-250, 50 % de metanol e 10 % de ácido acético glacial), durante 2h. Em seguida o gel foi transferido para uma solução descolorante (40% de metanol e 10 % de ácido acético glacial).

5.1.7.3 Western Blotting do fago contendo o gene da BTK-2mut

Para confirmar a presença do inserto ligado a PIII do fago, foi utilizada a técnica de *Western Blotting* com o objetivo de fazer a imunolocalização do epítopo FLAG, que conforme o desenho do vetor deve estar ligado à porção N-terminal da BTK-2mut (DA SILVA et al., 2010). Portanto, 20 µL das amostras, do fago com a BTK-2mut, fago com o scfv-D5 e o *helper phage* foram aplicadas em um gel a 12 % de SDS-PAGE. Em seguida foi efetuada a transferência para uma membrana de nitrocelulose e imunolocalizado com o anticorpo Anti-FLAG (Sigma Aldrich®), conforme segue:

O gel de SDS-PAGE foi imerso no tampão de transferência (3 g de Tris; 14,4 g de glicina; 200 mL de metanol, completar para 1 L com H₂O Milli-Q®) por 15 min., juntamente com os filtros e a membrana de nitrocelulose. Após a montagem do gel entre os filtros, procedeu-se com a transferência, utilizando o Trans-Blot SD Semi-DryTransferCell® (Biorad®) nas seguintes condições 10 V, 280 mA e 300 W por 45 min. A membrana em que foram transferidas as proteínas, foi incubada com a solução de bloqueio TBS (50 mM Tris-HCl e 150 mM NaCl, pH 7,4 com 3% de albumina sérica bovina), durante a noite toda.

No dia seguinte, a membrana foi incubada com o anticorpo primário (Anti-FLAG, Sigma Aldrich®) na diluição de 1:5000, durante 2 h, em seguida foram realizadas três lavagens com TBS. Depois, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário Anti-camundongo com fosfatase alcalina, (Sigma Aldrich®) em uma diluição de 1:15000, durante 2 h, na sequência foram realizadas mais três lavagens com TBS.

Para a visualização, a membrana foi imersa em uma solução de revelação (Tris pH 9,5; NaCl, MgCl₂ 2M e NTB CIP – Sigma Aldrich®) até a visualização das proteínas marcadas.

5.1.8 Kunkel Mutagênese

5.1.8.1 Produção de DNA simples fita uracilado – ss(U)DNA

Para a execução da *Kunkel* mutagênese é necessário a obtenção de DNA simples fita uracilado [ss(U)DNA], portanto, o fago pAPIIK2 foi utilizado para infecção de *E. coli* da linhagem CJ236 (*ung*-/*dut*-) resistente a cloranfenicol (NEB[®], Ipswich, USA), e suplementado com uridina para a obtenção de ss(U)DNA, conforme segue: uma alíquota de CJ236 (contendo gene de resistência para cloranfenicol) armazenada á -80 °C foi utilizada para semear uma placa de LB Agar / cloranfenicol (1 % de triptona, 0,5 % de extrato de levedura, 1 % de NaCl; 2 % de Agar e 5 µg / mL de cloranfenicol), incubada a 37 °C, durante a noite toda. No dia seguinte, uma colônia da placa foi inoculada em 50 mL de meio 2YT líquido / cloranfenicol (1 % de extrato de levedura; 1,6 % de triptona e 0,5 % de NaCl; pH 7 e 5 µg / mL de cloranfenicol), incubado a 37 °C a 200 rpm durante 2 h, após foi adicionado 60 µL do fago pAPIIK2 e incubado a 37 °C, 200 rpm, durante 1 h, em seguida, se acrescentou ampicilina (100 µg / mL) e seguiu incubado a 37 °C, 200 rpm por mais 1 h. Após foi adicionado uridina (6 mg / mL) e 2×10^{10} fagos / mL de *helper phage* para a montagem dos fagos, seguido de incubação a 37 °C, 200 rpm por 1 h. Finalmente se adicionou kanamicina (50 µg / mL) ao meio e foi incubado a 37 °C, 200 rpm, durante a noite toda.

No dia seguinte o fago foi recuperado do meio conforme descrito a seguir. O crescimento do dia anterior foi centrifugado a 3.500 g, 4 °C por 15 min, o sobrenadante transferido para um tubo cônico contendo 3 % de NaCl e 4 % de PEG 8.000 e mantido durante 5 min a 37 °C, 200 rpm para solubilização de partículas sólidas, após, foi mantido em gelo durante 1 h para precipitação. Em seguida o tubo foi centrifugado a 15.000 g durante 10 min, o sobrenadante descartado, a boca do tubo foi seca com papel toalha e o tubo mantido invertido durante 10 min em temperatura ambiente para a secagem. Em seguida o fago foi re-suspenso em 500 µL de PBT, a solução transferida para um microtubo de 1,5 mL e centrifugado a 15.000 g, 4°C durante 5 min para a remoção de materiais insolúveis. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e o ss(U)DNA foi obtido por meio da extração do DNA do fago, utilizando o kit QIAprep Spin M13 Kit[®] (QUIAGEN[®]).

5.1.8.2 Mutação sítio dirigida

Para a geração da biblioteca de *phage display* foram utilizados iniciadores degenerados para a inserção de mutações na porção C-terminal da alfa-hélice (P2deg.) e no loop menor (P4deg.) do gene da proteína BTK-2mut (Tabela 4).

Tabela 4 – Iniciadores degenerados utilizados para a *Kunkel* mutagênese, sublinhada a região para a inserção das mutações (S=G/C e N=A/G/C/T).

PRIMERS	SEQUÊNCIAS
P2deg.	TGCTGCCCTACCTGCGCAS <u>NNNSNNSNNG</u> CAS <u>NNNSNNG</u> CAACCC ACAGAACCACC
P4deg.	ATTGTTGCATTTGCACACS <u>NNSNNTT</u> CGCACGTCGGTGC

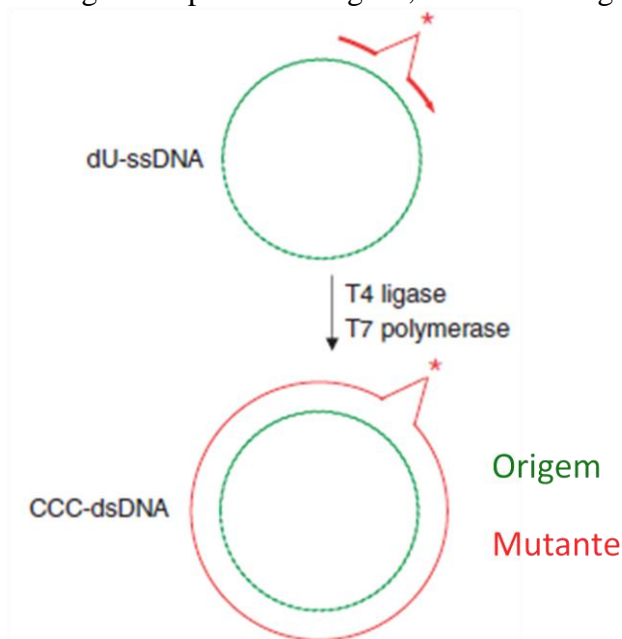
Fonte: produção do autor, 2017.

Os iniciadores degenerados foram sintetizados fosforilados nas regiões 5' e 3' (IDT®). O P2deg e P4deg. foram utilizados em uma proporção de 3:1 molar em relação ao pAPIIK2 (4.217 pb). Antes de montar a reação, os iniciadores foram diluídos em uma concentração de 0,001 µg / µL. O ss(U)DNA foi obtido em uma concentração de 12,8 ng / µL.

A *Kunkel* mutagênese foi montada conforme segue: ss(U)DNA 78 µL (1 µg); P2 3,9 µL (0,039µg); P4 2,7 µL (0,027µg); 0,5 x tampão T4 DNA ligase (Ludwig Biotec®) e 0,5 x tampão T4 DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific®).

Para a produção do híbrido de DNA heteroduplex (Figura 10) a reação foi mantida em um termociclador Biocycler® nas seguintes condições: 90 °C por 2 min; 50 °C por 3 min e 20 °C por 5 min. Então foi adicionado a reação 1 mM de dntp, 10 U de T7 DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific®) e 5 U de T4 DNA ligase (Ludwig Biotec®), e a reação mantida a 20 °C durante 4 h.

Figura 10 – Produção do híbrido de DNA heteroduplex: em vermelho, DNA *mutante* e em verde DNA *origem* uracilado. A heteroduplex foi construída a partir do anelamento de *primers* degenerados nas regiões onde se deseja inserir mutações ao gene da proteína exógena, inserida no fagomídeo.



Fonte: adaptado de Tonikian et al., (2007).

5.1.8.3 Amplificação por Círculo Rolante Seletivo do produto da Kunkel Mutagênese

Com o objetivo de melhorar a inserção das mutações no esqueleto protéico BTK-2*mut* foi utilizada a técnica de Amplificação por Círculo Rolante Seletivo (ACRS), adaptada de Huovinen et al., 2012. Inicialmente foram utilizados 14 µL do DNA heteroduplex obtido a partir da *Kunkel* Mutagênese para tratamento com UDG (Uracil-DNA Glicosilase), utilizando 1 x do tampão de reação UDG e 1 U de UDG (Thermo Fisher Scientific®). A reação foi mantida a 37°C por 15 min. Em seguida a reação foi purificada utilizando o kit PureLink® Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen®) conforme instruções do fabricante e o DNA Heteroduplex UDG tratado foi eluído em 50 µL tampão de eluição (kit PureLink® Quick Plasmid Miniprep).

A reação de ACRS foi montada conforme segue: 5 µL do DNA Heteroduplex UDG tratado, 1 mM de dntp, 50 µM de *primers* Randômicos Hexo-resistentes (Thermo Fisher Scientific®), 1 x tampão da phi29 DNA polimerase, 10 U da phi29 DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific®), a reação foi incubada durante a noite toda a 30°C e inativada durante 10 min a 70 °C.

O DNA concatâmero obtido da reação de ACR foi digerido com a enzima *XhoI*. Para a reação de digestão foram utilizados 20 µL da reação de ACR; 1 x de tampão D e 20 U de *XhoI* (Promega®); 0,2 µL de BSA (New England Biolabs Inc.) e a reação foi mantida por 2 h a 37 °C.

Os monômeros de DNA obtidos na digestão foram purificados utilizando o kit PureLink® Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen®) conforme instruções do fabricante e o DNA linear foi eluído em 50 µL tampão de eluição (kit PureLink® Quick Plasmid Miniprep). Finalmente o DNA foi re-circularizado conforme segue: 2 µL de DNA linear; 1 x tampão T4 DNA ligase e 10 U de T4 DNA ligase (Ludwig Biotec®) e a reação foi mantida por 5 h em temperatura ambiente, em seguida a reação foi inativada à 65 °C por 10 min.

5.1.8.4 Produção de *E. coli* linhagem XL1B eletrocompetente com helper phage

Para a produção de bibliotecas de *phage display* são necessárias células altamente competentes que permitam a geração de um maior número possível de células transformantes, pois, objetiva-se cobrir a variedade teórica de mutações que possam ser geradas após a mutagênese sítio dirigido. Portanto, foram produzidas células de XL1Blue eletrocompetentes, previamente infectadas com o *helper phage*, utilizando o protocolo adaptado de Tonikian et al. (2007), conforme descrito a seguir:

No primeiro dia foi semeada uma placa de LB / Tet com o estoque em glicerol da linhagem XL1Blue de *E. coli* e incubada a 37 °C durante a noite toda.

No dia seguinte, foram inoculados 25 mL de meio 2YT / Tet utilizando uma colônia crescida na placa de LB / Tet e incubado a 37 °C, 200 rpm até alcançar a DO₅₅₀ – 0,8. Então, o *helper phage* M13KO7 foi diluído conforme segue, em um micro tubo de 1,5 ml foi adicionado 20 µL de M13KO7 com 180 µL de meio 2YT, foram retirados 20 µL desse tubo e repassado para o tubo seguinte, também contendo 180 µL, e assim sucessivamente até a diluição 10⁻¹⁰. Foram adicionados às diluições 500 µL de *E. coli* XL1Blue (D.O.₅₅₀ – 0,8) e 4 mL de 2YT top agar (1 % de extrato de levedura; 1,6 % de triptona e 0,5 % de NaCl; pH 7 e 0,6% de agarose) previamente autoclavado e mantido a 37 °C para evitar a solidificação. Em seguida, as diluições de *helper phage* em

XL1Blue e 2YT top agar foram distribuídas em placas de LB / tet, e incubadas a 37 °C, durante a noite toda.

No terceiro dia uma unidade formadora de placa (UFP) foi excisada da placa na diluição 10^{-8} e inoculada em 1 mL de meio 2YT / Kan / Tet (1 % de extrato de levedura; 1,6 % de triptona e 0,5 % de NaCl; pH 7; 10 µg / mL de tetraciclina e 30 µg / mL de kanamicina) e incubada durante 8 h a 37°C. Depois, essa cultura foi transferida para 125 mL de 2YT / Kan (1 % de extrato de levedura; 1,6 % de triptona e 0,5 % de NaCl; pH 7 e 30 µg / mL de kanamicina) em um erlenmeyer de 1 L, e incubado a 37°C com agitação a 200 rpm durante a noite toda.

No quarto dia foram inoculados dois Erlenmeyers de 1 L contendo cada um 450 mL de meio Supercaldo / kan / Tet (2,4 % de extrato de levedura; 1,2 % de triptona; 5 mL de glicerol e 10 % de 0,17 M KH_2PO_4 / 0,72 M K_2HPO_4 ; 5 µg / mL de tetraciclina e 25 µg / mL de kanamicina) com 2,5 mL do crescimento total para cada um dos Erlenmeyer. Em seguida foram incubados a 37 °C com agitação a 200 rpm até alcançar a $\text{DO}_{550} = 0,8$. Resfriados em gelo durante 5 min. A cultura foi transferida para frascos de centrífuga de 500 mL e centrifugados a 3.500 g a 4°C por 10 min. Então o sobrenadante foi descartado e cada precipitado solubilizado em 500 mL de HEPES 1 mM, pH 7,4, e adicionadas barras magnéticas autoclavadas, então, os precipitados foram dissolvidos em velocidade moderada com o auxílio de um agitador magnético e novamente centrifugados a 3.500 g, 4°C por 10 min e o sobrenadante foi descartado, tomando o cuidado de reter a barra. A lavagem dos precipitados com HEPES 1 mM, pH 7,4 foi executada duas vezes, conforme descrito acima. Após, cada precipitado foi dissolvido em 100 mL de glicerol 10%, separadamente e centrifugado a 3.500 g a 4°C por 15 min., o sobrenadante descartado, os resíduos do sobrenadante removidos com uma pipeta e as barras magnéticas retiradas. Em seguida foi adicionado 3 mL de glicerol 10% por tubo, os precipitados re-suspensos por pipetagem e transferidos para um único tubo, e feitas alíquotas de 350 µL em microtubos de 1,5 mL. Finalmente, as alíquotas de XL1B foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenar a -80 °C.

5.1.8.5 Transformação da biblioteca em *Escherichia coli* XL1Blue eletrocompetente

Para a transformação da biblioteca, toda reação de ligação feita a partir de 2 µL de monômeros de DNA (385,8 ng) obtidos após a digestão com a *XhoI* (Promega), foi adicionada a uma alíquota de 350 µL de XL1B eletrocompetentes preparadas com *helper phage* (XL1Blue – M13KO7) e eletroporada com uma cuveta de 0,2 cm em um eletroporador Eporator[®] (Eppendorf[®]) à 2.500 v. Após a eletroporação as células foram re-suspendidas em 1 mL de SOC pré-aquecido e em seguida transferidas para 10 mL de meio SOC em um erlenmeyer de 250 mL, novamente foi adicionado meio SOC para completar o volume de 25 mL e incubado a 37 °C, 200 rpm a 37 °C por 30 min.

Com o objetivo de determinar a diversidade da biblioteca foram feitas diluições seriadas em uma placa de 96 poços conforme segue: no primeiro poço foram transferidos 10 µL do crescimento de XL1Blue – M13KO7 em que a biblioteca foi transformada em 90 µL de meio 2YT e a partir do primeiro poço foi retirado 10 µL para ser incorporado a 90 µL de 2YT no segundo poço e assim sucessivamente até o 15 ° poço da placa (10^{-1} a 10^{-15}). Após, 10 µL de cada diluição foi plaqueado em placas de LB / Amp e incubadas a 37 °C, durante a noite toda, para determinar a diversidade da biblioteca. O restante da cultura em meio SOC foi transferido para um Erlenmeyer de 2 litros contendo 500 mL de meio 2YT, adicionado de ampicilina (100 µg / µL), tetraciclina (10 µg / µL), kanamicina (30 µg / µL) e incubado a 37 °C, 200 rpm, durante a noite toda.

Para a precipitação dos fagos da biblioteca o crescimento do dia anterior foi centrifugado a 3.500 g a 4 °C por 15 min, o sobrenadante transferido para tubos cônicos de 50 mL contendo 3 % de NaCl e 4 % de PEG 8.000 e mantido durante 5 min a 37 °C, 200 rpm para solubilização dos resíduos sólidos, após, foi mantido em gelo durante 1 h para precipitação. Em seguida o tubo foi centrifugado a 15.000 g durante 10 min, o sobrenadante descartado, a boca do tubo foi seca com papel toalha e o tubo mantido invertido durante 10 min em temperatura ambiente para a secagem. Depois, o fago foi re-suspenso em 20 mL de PBT, feitas alíquotas de 900 µL em microtubo de 1,5 mL e centrifugado a 15.000 g, 4°C durante 5 min. para a remoção de sólidos. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo, adicionado 10 % de glicerol. A biblioteca pAPIIK2mut foi armazenada a -80 °C.

Também, no dia seguinte, após a quantificação das colônias na placa utilizada para determinação do tamanho da biblioteca, foram selecionadas seis colônias ao acaso, inoculadas em meio LB / Amp e incubadas a 37 °C, 250 rpm, durante a noite toda. Então, o crescimento foi centrifugado a 3.500 g, 4 °C e o precipitado bacteriano utilizado para a extração do DNA plasmidial, que foi enviado para a empresa Ludwig Biotec LTDA para ser sequenciado e com isso, determinar a inserção de mutações obtidas após a construção da biblioteca.

5.1.9 Infecção de *Balb/c* com *T. evansi* para a seleção *in vivo*

Para a elaboração da seleção *in vivo*, um camundongo (*Balb/c*) foi infectado por injeção intraperitoneal com 10^5 formas tripomastigotas de *T. evansi*, cepa gentilmente cedida pela Professora Dra. Silvia Gonzalez Monteiro (Laboratório de Parasitologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria). O animal foi acompanhado diariamente com a realização de esfregaços sanguíneos corados com Panótico Rápido® e visualizados no microscópio óptico (aumento de 400 vezes).

5.1.10 Seleção *in vivo* contra *T. evansi*

No terceiro dia após a infecção, quando a parasitemia alcançou 10^7 parasitos por campo, aproximadamente 10^9 parasitos / mL, o animal foi previamente anestesiado com 0,1 mL de xilazina / quetamina / solução fisiológica (1/5 : 2/5 : 2/5), contido e aplicado 200 µL da biblioteca pAPIIK2-4 / solução fisiológica (1/2 : 1/2) pela veia caudal. Passados 20 min o camundongo foi colocado em câmara com éter e mantido até a perda dos reflexos interdigitais, então, se prosseguiu com a abertura do tórax e punção cardíaca de 1,5 mL de sangue utilizando uma seringa descartável de 5 mL com EDTA 500 mM e agulha estéril 25 x 7 mm (Figura 11).

Figura 11 – Coleta de sangue por punção cardíaca em um camundongo infectado com *T. evansi*.



Fonte: produzido pelo autor, 2017.

Para a obtenção dos fagos ligados ao *T. evansi* no *round in vivo*, inicialmente a forma tripomastigota foi purificada em coluna de DEAE celulose. O sangue coletado do camundongo foi misturado com igual quantidade de Percoll[®] tamponado com HEPES, pH 7,4 %, contendo 8,5 % de sacarose e 2,5 % de D-glicose (GRAB & BWAYO, 1982). Então, centrifugada a 15.000 g por 25 min a 4 °C. Os parasitos foram recuperados das fases superior e mediana do gradiente de Percoll[®], ressuspensos em 10 mL de PBS-G (0,78g/L NaH₂PO₄.1H₂O, 13,48g/L NaH₂PO₄, 4,25g/L NaCl, 15g/L D-glicose, ajustar para pH 8,0) em um tubo cônico de 15 mL. Em seguida os parasitos foram separados por cromatografia em coluna de DEAE-celulose, a coluna foi carregada em uma proporção de 1 : 2 volumes (*T. evansi* em Percoll[®] : PBS-G) (Figura 12).

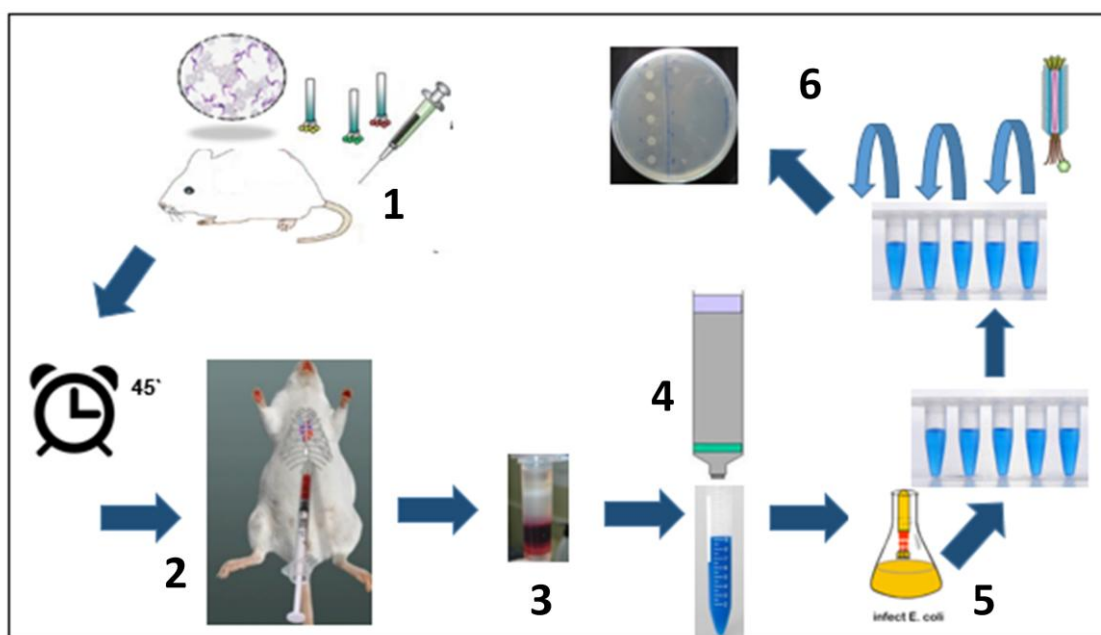
Figura 12 – Cromatografia do sangue dos camundongos infectados através de coluna de DEAE - celulose para separação de formas tripomastigotas de *T. evansi* dos leucócitos murinos.



Fonte: produzido pelo autor, 2017.

Após passar todo o volume na coluna, o tubo coletor foi centrifugado a 15.000 g por 15 min a 4 °C, em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi eluído em 350 µL de HCl 100 mM, centrifugado a 3.500 g por 5 min em temperatura ambiente, finalmente, o fago foi recuperado junto com o sobrenadante, transferido para um micro tubo de 1,5 mL e adicionado 50 µL de Tris-HCl pH 11 com o objetivo de redobrar a proteína PIII desnaturada pelo HCl (Figura 13). Para a titulação do *round* um em placa foram utilizados 10 µL e o restante foi armazenado a 4 °C para a amplificação do *round out* um em *E. coli* XL1Blue para utilização no próximo *round*.

Figura 13 – *Round in vivo*. Um camundongo infectado com *T. evansi* foi inoculado com a biblioteca pAPIIK2-4 (1), após 45 minutos, o animal foi sacrificado e o sangue foi coletado (2). Então o sangue foi centrifugado em gradiente de Percoll® para separação do precipitado de leucócitos (3). O *T. evansi* foi separado dos leucócitos por cromatografia (4). Após a separação, os fagos ligantes foram eluídos do *T. evansi* com HCl (100 mM), o sobrenadante recuperado e a proteína BTK-2 redobrada com a adição de Tris-HCl pH 11. Finalmente o fago foi utilizado para infectar *E. coli* XL1B (5) e titulado (6).



Fonte: produzido pelo autor, 2017.

5.1.10.1 Titulação dos fagos obtidos no round out in vivo

Os fagos obtidos no primeiro *round out* foram titulados em *E. coli* XL1Blue juntamente com o *round in* da biblioteca pAPIIK2-4 para calcular a taxa de enriquecimento dos fagos selecionado a cada *round*, conforme descrito a seguir: no dia anterior a titulação, foi semeada uma placa de LB tetra com o estoque de XL1Blue congelado em glicerol, no dia seguinte, 50 mL de meio 2YT foi inoculado com uma colônia de XL1Blue da placa semeada no dia anterior e incubado a 37 °C, com agitação a 200 rpm até alcançar uma $DO_{600} = 0,6$. Para a titulação foram utilizadas placas de cultivo celular de 96 poços, em todos os poços que foram utilizados para a titulação foi adicionado 90 µL de meio 2YT e no primeiro poço de cada linha foi adicionado 10 µL do respectivo *round* a ser titulado junto aos 90 µL de meio 2YT, a diluição seguiu com a adição de 10 µL do primeiro poço para o seguinte e assim sucessivamente até a

diluição 10^{-10} . Após a diluição, em outra placa foram adicionados 90 μ L do crescimento de XL1Blue na mesma sequência utilizada na placa em que foi feita a diluição, em seguida, 10 μ L de cada diluição foi transferido para os 90 μ L do cultivo de XL1Blue, sempre obedecendo à ordem da placa anterior. Após, a infecção, a placa de cultivo celular foi incubada a 37 °C por 20 min, 10 μ L de cada diluição foram plaqueadas em LB / Amp. e incubadas a 37 °C, durante a noite toda.

5.1.10.2 Amplificação do *round out* em *E. coli* XL1Blue.

Os fagos recuperados após a primeira seleção foram amplificados em *E. coli* XL1Blue para ser utilizado no próximo *round in vitro*, para isso uma placa de LB / tetra foi semeada com o estoque de XL1Blue congelado em glicerol, no dia seguinte, 50 mL de meio 2YT foi inoculado com uma colônia de XL1Blue da placa semeada no dia anterior e incubado à 37 °C, a 200 rpm até alcançar uma $DO_{600} = 0,6$. Então, o cultivo foi infectado com 20 μ L do fago *round out in vivo*, após 1 h foi adicionado 100 μ g / mL de ampicilina, passado mais 2 h, se adicionou 1 mL de *helper phage* e 1h depois 30 μ g / mL de kanamicina. O cultivo foi mantido durante a noite toda à 37 °C, com agitação a 200 rpm. No dia seguinte o cultivo foi transferido para um tubo cônico de 50 mL, centrifugado a 3.500 g, durante 15 min à 4 °C, o sobrenadante transferido para outro tubo de 50 mL contendo PEG 8.000 4 % (m / v) e NaCl 3 % (m / v), mantido à 37 °C, 200 rpm, por 10 min. Em seguida, foi mantido em gelo por 1 h para precipitação dos fagos, centrifugado a 15.000 g, durante 15 min à 4 °C. Após, o sobrenadante foi descartado, o precipitado foi ressuspenso em 500 μ L de PBT, transferido para um microtubo de 1,5 mL e o fago obtido do primeiro *round in vivo* (Fago R1) foi armazenado à 4 °C para ser utilizado no próximo *round*.

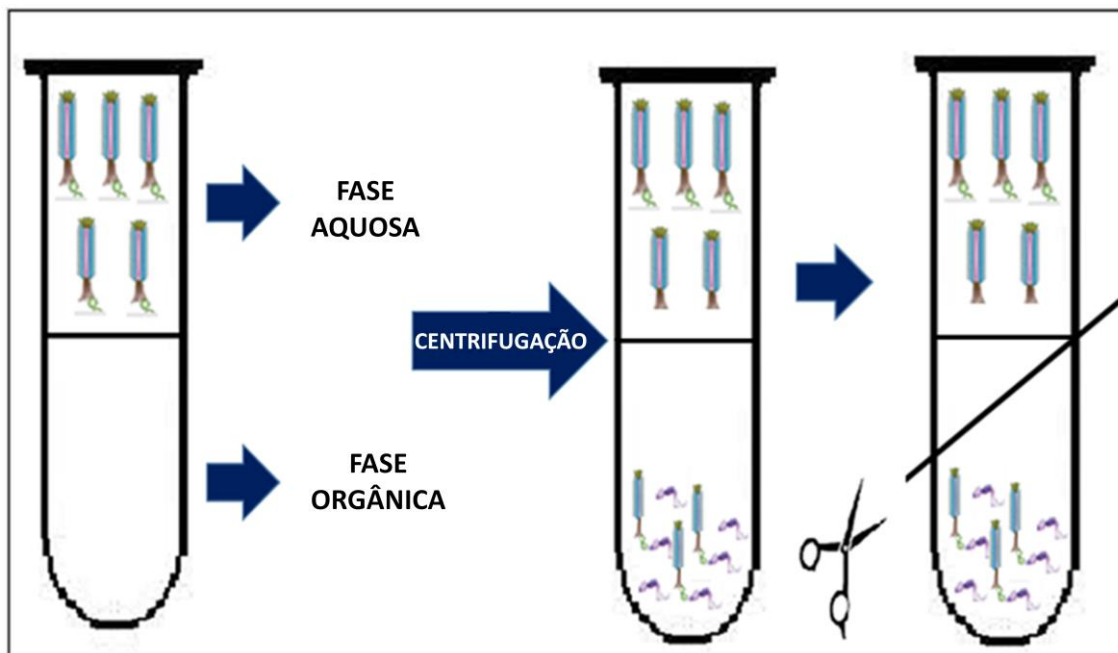
5.1.11 Seleção *in vitro* contra *T. evansi* round dois e três

No terceiro dia após a infecção, quando a parasitemia alcançou 115 parasitos por campo, aproximadamente 10^7 parasitos / mL, o animal foi sacrificado, conforme descrito no item **3.1.10**.

Foram coletados 02 tubos com 14 mL cada e utilizados para o segundo e terceiro rounds *in vitro*. Utilizando uma câmara de Neubauer foram contados 131 parasitos nos 25 quadrantes centrais (52.400 parasitos / mL), totalizando $7,33 \times 10^5$ parasitos por tubo. Para os rounds *in vitro* foi utilizado o método BRASIL (*Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands*) adaptado de Giordano et al., 2001.

Para o segundo round foi utilizado um dos tubos com 14 mL de PBS-G contendo parasito, este foi centrifugado à 3.500 g por 25 min. à 4 °C, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspenso em 1 mL de PBT. Em seguida, foram transferidos 200 µL de PBT contendo o parasito para um microtubo de 1,5 mL previamente bloqueado com PBT, adicionado igual quantidade do round out *in vivo* amplificado e feita a ligação por 1 h, em seguida, 100 µL da ligação Fago R1 – *T.evansi* foi transferida para um microtubo de 0,6 mL, sobre 200 µL de uma solução não miscível com baixa fase orgânica de *dibutil ftalato* : *ciclohexano* (9 : 1), centrifugada a 10.000g por 10 min. Após a centrifugação o tubo foi rapidamente congelado em nitrogênio líquido, cortada a parede da base externa do tubo, onde ocorreu a deposição do material centrifugado, sendo a base recortada e seu conteúdo depositado em um microtubo de 1,5 mL. Após, foi eluído em 350 µL de HCl 100 mM, centrifugado a 3.500 g por 5 min em temperatura ambiente, finalmente, o fago foi recuperado junto com o sobrenadante, transferido para um micro tubo de 1,5 mL e adicionado 50 µL de Tris-HCl pH 11 para redobrar a proteína PIII desnaturada (Figura 14).

Figura 14 – *Round in vitro* – Método BRASIL. O *T. evansi* foi incubado com a biblioteca pAPIIK2-4 (Fago R1), o *T. evansi* e o *T. evansi* ligado ao Fago R1 foram separados por centrifugação através da fase orgânica. O precipitado obtido na fase orgânica foi recuperado após o congelamento do tubo. Em seguida os fagos ligantes foram eluídos do *T. evansi* com HCl (100 mM), o sobrenadante recuperado e a proteína BTK-2 redobrada com a adição de Tris-HCl pH 11. Finalmente o fago foi utilizado para infectar *E. coli* XL1B e titulado.



Fonte: produzido pelo autor, 2017.

A titulação do *round out* dois em placa foi executada conforme descrito anteriormente no item 3.1.10.1, outros 20 µL foram utilizados para a amplificação do *round out* dois em *E. coli* XL1Blue, conforme descrito no item 3.1.10.2. O amplificado foi utilizado no próximo *round*, conforme descrito no item 3.1.11 e o restante foi armazenado a 4 °C.

Para o terceiro *round* outro tubo com 14 mL de PBS-G contendo parasito, coletado no dia anterior e mantido à 4 °C, foi centrifugado à 3.500 g por 25 min. à 4 °C, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspenso em 1 mL de PBT, 200 µL foram usados para a ligação com 200 µL do primeiro *round out in vitro* amplificado (Fago – R2) e submetido ao método BRASIL para seleção de ligantes contra o *T. evansi*, conforme descrito no item 3.1.11. Após a eluição dos fagos ligantes procedeu-se com a titulação do segundo *round out in vitro* ou terceiro *round out* (Fago – R3) conforme descrito no item 3.1.10.1.

5.1.12 Estudo da eficiência de ligação contra *T. evansi* dos clones obtidos a partir do terceiro *round out*.

Foram escolhidas aleatoriamente seis colônias a partir da placa de titulação do último *round out*, inoculadas em erlenmeyers com 50 mL de meio 2YT / Amp., incubados a 37 °C, 200 rpm, durante 2 h., após, foi adicionado 2×10^{10} de *helper phage* e 1h depois 30 µg / mL de kanamicina. O cultivo foi mantido a 37 °C, 200 rpm, durante a noite toda.

No dia seguinte o cultivo foi transferido para um tubo cônico de 50 mL, centrifugado a 3.500 g, durante 15 min. à 4 °C e parte do sobrenadante armazenado em microtubos de 1,5 mL para serem utilizados para a ligação com *T. evansi* e verificar qual ou quais dos 6 clones tem uma maior afinidade contra o alvo. O fago monoclonal (Fago – pAPIIK2) contendo a proteína de Domínio Kunitz BTK-2mut foi utilizado como controle nos ensaios de ligação com o *T. evansi*.

Para testar os clones, um camundongo foi previamente infectado com *T. evansi*, no quarto dia após a infecção, quando a parasitemia alcançou 148 parasitos por campo, aproximadamente 10^7 parasitos / mL, o animal foi previamente anestesiado e sacrificado para que fosse feita a coleta e purificação do *T. evansi*, conforme descrito anteriormente no item 3.1.10. Foram obtidos $5,6 \times 10^5$ parasitos / mL.

Para o ensaio de ligação com o objetivo de identificar o / ou melhores clones contra *T. evansi* dentre os 6 escolhidos aleatoriamente após o terceiro *round*, cada clone foi submetido a uma ligação com o *T. evansi*, para isso, 6 tubos contendo 200 µL de PBT com aproximadamente 113.200 parasitos cada, foram transferidos para tubos previamente bloqueados com PBT e adicionado 200 µL, em cada tubo, do sobrenadante obtido do crescimento dos 6 clones de fagos oriundos do terceiro *round out*. Após 1h de ligação foi utilizado o método BRASIL (Giordano et al., 2001), conforme descrito anteriormente no item 3.1.11.

Os fagos eluídos após a ligação ao *T. evansi* pelo método BRASIL foram titulados com seus respectivos *inputs* até a diluição 10^{-12} em placas de cultivo celular de 96 poços, as diluições foram utilizadas para infectar um cultivo de XL1B (O.D.₆₀₀ = 0,6) e em seguida as diluições foram plaqueadas em meio LB / Amp., incubadas a 37 °C, durante a noite toda, conforme o item 3.1.10.1. No dia seguinte as colônias da última diluição *in* e *out* foram quantificadas, e calculado a proporção de fagos ligantes.

5.1.13 Estudo da eficiência de ligação contra *T. cruzi* e *T. rangeli* dos clones selecionados a partir do terceiro *round out*

Os seis clones selecionados, juntamente com o controle (Fago BTK-2*mut*) foram testados contra o *T. evansi*, e também submetidos a uma seleção negativa com os tripanosomatídeos não alvo, *T. cruzi* e *T. rangeli* (as amostras foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Edmundo C. Grisard do Laboratório de Protozoologia da UFSC) para verificar a especificidade contra *T. evansi*. Para o estudo, os clones e o controle foram submetidos a uma ligação com o *T. evansi*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*. Aproximadamente 10^5 parasitos foram utilizados para a ligação com os fagos. Os precipitados foram lavados com tampão PBT e resuspenso em 200 μ L de PBT, transferidos para tubos previamente bloqueados com PBT e adicionados 200 μ L do sobrenadante obtido do crescimento dos fagos clones, oriundos do terceiro *round out* e do fago monoclonal. Após 1h de ligação os fagos unidos aos tripanosomatídeos foram recuperados utilizando o método BRASIL, conforme descrito anteriormente no 3.1.11. Após, foram eluídos e titulados com seus respectivos *inputs* em uma diluição de 10^{-1} a 10^{-12} , sendo então utilizados para infectar *E. coli* linhagem XL1B, plaqueadas em meio sólido LB / Amp, incubadas a 37 °C, durante a noite toda, conforme o item 3.1.10.1, para serem quantificados.

5.1.14 Estudo da eficiência de ligação e do efeito tripanocida contra *T. evansi* dos clones obtidos a partir do terceiro *round out*, utilizando citometria de fluxo

*5.1.14.1 Estudo da eficiência de ligação dos seis clones contra *T. evansi*, marcados com FITC, e analisados por meio da citometria de fluxo.*

Os DNAs plasmidiais dos seis clones e o controle pAPIIK2 foram transformados em XL1Blue eletrocompetente, para as transformações foram utilizados 1 μ L de cada plasmídeo em alíquotas de 50 μ L de XL1Blue, as células eletrocompetentes foram descongeladas em gelo e após a adição da ligação, a mistura foi homogeneizada e colocada em uma cuveta de 0,1 cm, em gelo, depois foi aplicada

uma descarga de 1.700V, adicionado 500 µL de meio SOC, pré-aquecido a 37°C e incubado por 1 h a 200 rpm. Após o meio foi concentrado por centrifugação a 1.500g durante 5 min. e plaqueado em LB / Amp e incubado a 37 °C, durante a noite toda, então, os fagos foram montados No dia seguinte uma colônia de XL1Blue foi selecionada, colocada em 1 mL de meio LB com 30 µg / mL de ampicilina, 15 µg / mL de tetraciclina e incubado a 37°C, 200 rpm, durante 1h, em seguida foi adicionado 45 µg / mL de ampicilina e incubado por mais 1h. Após, o cultivo foi infectado com 2×10^{10} fagos / mL de *helper phage*, transferido para um ernlenmeyer de 250 mL, contendo 40 mL de LB, 50 µg / mL de ampicilina e 10 µg / mL de tetraciclina e incubado a 37 °C, 200 rpm, durante 1h. Em seguida, foram adicionados 45 µg / mL de kanamicina ao cultivo e incubado a 37°C, 200 rpm, durante a noite toda.

No dia seguinte o meio foi transferido para um tubo cônico de 50 mL e centrifugado a 3500 g, 4 °C por 15 min. O sobrenadante foi transferido para um tubo cônico de 50 mL, contendo 3 % de NaCl e 4 % de PEG 8000, mantido durante 5 min. a 37°C, 200 rpm para solubilização dos sólidos, em seguida, foi incubado em gelo durante 1 h para precipitação. Após a precipitação o tubo foi centrifugado a 15.000 g durante 10 min., o sobrenadante descartado, a boca do tubo seca com papel toalha e o tubo mantido invertido, em temperatura ambiente para a secagem, durante 10 min.

Finalmente o fago foi re-suspenso em 500 µL de tampão PBT (PBS pH 7,4; 0,5 % de BSA; 0,05 % de Tween 20), transferido para um microtubo de 1,5 mL e centrifugado a 15.000 g, 4°C durante 5min. para a remoção de partículas sólidas. Após, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo de 1,5 mL para serem utilizados no ensaio de citometria de fluxo, onde foi verificado o potencial de ligação e de uma possível toxicidade das proteínas mutantes apresentadas pelos fagos clones sobre o *T. evansi*.

Os parasitos para o ensaio foram obtidos de um camundongo infectado. A parasitemia foi acompanhada diariamente a partir de esfregaços sanguíneos. No terceiro dia após a infecção, quando a parasitemia alcançou aproximadamente 10^7 parasitos por campo, aproximadamente 10^9 parasitos / mL, o animal foi sacrificado para a coleta do sangue, utilizado para a separação dos leucócitos junto com os parasitos. Em seguida, a papa de leucócitos foi utilizada para a separação do *T. evansi* em coluna de DAE - celulose do *T. evansi* (conforme descrito no item 10.1.10). As amostras do parasito para o ensaio com cada clone foram preparadas conforme segue: inicialmente 7 microtubos

de 1,5 mL contendo aproximadamente 10^5 parasitos foram centrifugados a 15.000 g para a retirada do PBS-G, novamente suspensos em 1 mL de PBS-G com 1 % de BSA e bloqueados durante 30 minutos. Em seguida foram centrifugados novamente a 15.000 g para a retirada do tampão de bloqueio, e após, lavados com 1 mL de PBS-G, submetidos a uma nova centrifugação a 15.000 g para a precipitação do *T. evansi* e descarte do PBS-G. Foram feitas três lavagens após cada processo de bloqueio, ligação com os fagos, anticorpos primários e secundários.

O primeiro ligante adicionado ao *T. evansi* foram os 6 fagos clones e um controle (fago apresentando a proteínas BTK-2mut original utilizada para a montagem da biblioteca). Depois foi adicionado o anticorpo primário anti-M13 e em seguida o anti-camundongo marcado com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC). Previamente as adições de cada componente foram feitas três lavagens com PBS-G, conforme descrito anteriormente e os tempos de incubação foram de 30 min. Após a última lavagem, o precipitado de *T. evansi* de cada tubo foi re-suspendido em 500 µL de tampão para citometria de fluxo contendo PBS (pH 7,4); 0,1 % de azida sódica; 1% de BSA. A leitura no equipamento foi elaborada no comprimento FL1A para a leitura da fluorescência do FITC.

5.1.14.2 Estudo de toxicidade de cinco clones contra T. evansi, marcados com iodeto de propídio, e analisados por meio da citometria de fluxo.

Os fagos dos seis clones e o controle pAPIIK2, produzidos na etapa anterior para o teste de afinidade ao *T. evansi*, também foram utilizados para o estudo de toxicidade contra o parasito. Para isso, um camundongo foi inoculado com *T. evansi* e no terceiro dia após a infecção, se verificou uma infecção de aproximadamente 10^9 parasitos por campo, aproximadamente 10^7 parasitos / mL, então, o animal foi sacrificado para a coleta do sangue, e os parasitos obtidos conforme o descrito no ítem anterior.

Na sequência, foram utilizados por tratamento, aproximadamente 10^6 parasitos por microtubo de 1,5 mL, para os seguintes tratamentos: *T. evansi* em 350 µL PBS-G com 150 µL do fago clone 1; *T. evansi* em 350 µL PBS-G com 150 µL do fago clone 2; *T. evansi* em 350 µL PBS-G com 150 µL do fago clone 3; *T. evansi* em 350 µL PBS-G

com 150 μ L do fago clone 4; *T. evansi* em 350 μ L PBS-G com 150 μ L do fago clone 5 e como controles foram utilizados, somente *T. evansi* em 500 μ L PBS-G; *T. evansi* em 350 μ L PBS-G com 150 μ L de *helper phage*; *T. evansi* em 350 μ L PBS-G com 150 μ L do fago pAPIIK2. Todos os tratamentos e controles foram incubados durante 1h e em seguida, os tubos foram centrifugados, o sobrenadante descartado e o precipitado de *T. evansi* resuspenso em adicionado

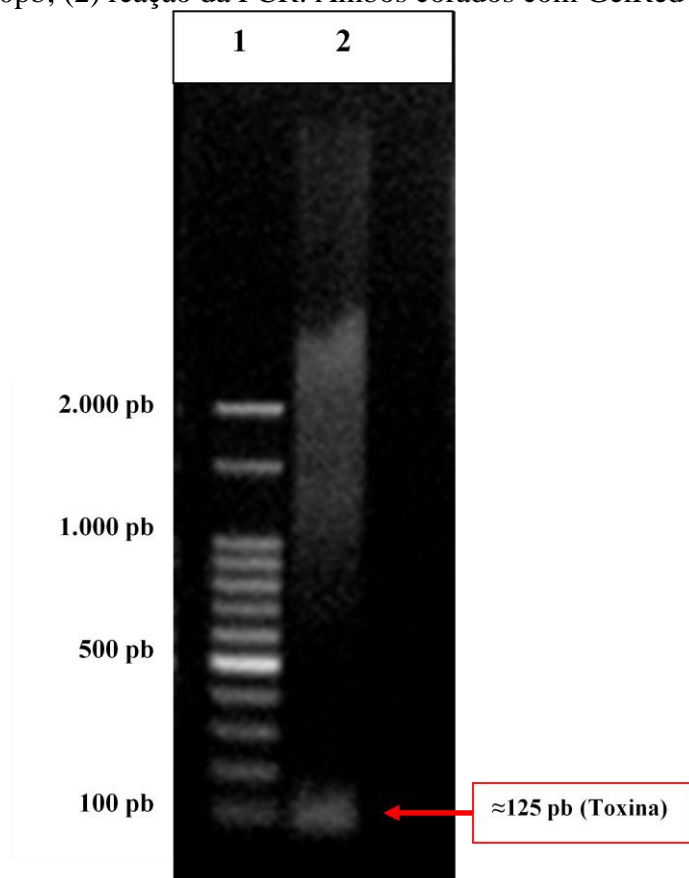
Após a última lavagem, o precipitado de *T. evansi* de cada tubo foi resuspendido em 500 μ l de tampão para citometria de fluxo contendo PBS (pH 7,4); 0,1 % de azida sódica; 1% de BSA e adicionado o iodeto de propídio (20 ng / mL). A leitura no equipamento foi executada no comprimento FL2A para captação da fluorescência do iodeto de propídio.

6 RESULTADOS

6.1 CONFIRMAÇÃO DA CONSTRUÇÃO DA PROTEÍNA DE DOMÍNIO *KUNITZ* BTK-2*MUT*.

Depois das reações para anelamento dos oligonucleotídeos para a montagem do gene BTK-2*mut*, o produto obtido foi utilizada como molde para uma PCR utilizando os iniciadores P1 e P5 e analisado em um gel de agarose 1%, demonstrando a amplificação de um fragmento de 125 pb (Figura 15).

Figura 15 – Eletroforese em gel de agarose a 1% da PCR, para a confirmação da construção da proteína BTK-2*mut*: (1) marcador de peso molecular de 100pb; (2) reação da PCR. Ambos corados com GelRed® (Biotium®).

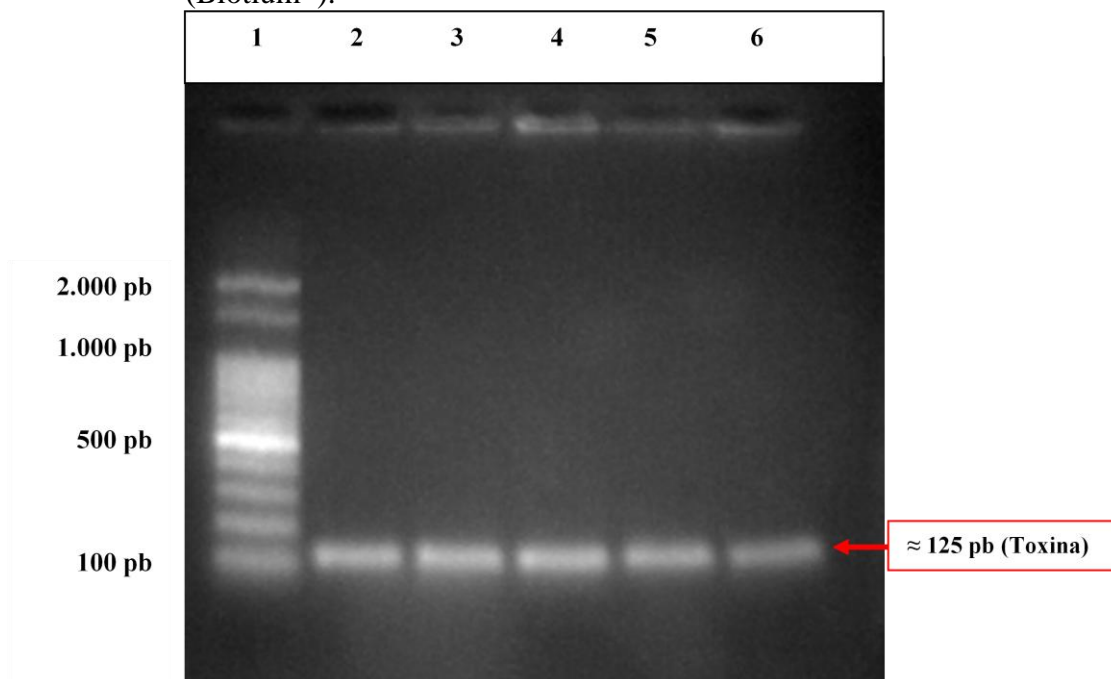


Fonte: produzido pelo autor, 2017.

6.2 CLONAGEM DO GENE DA PROTEÍNA DE DOMÍNIO *KUNITZ* BTK-2MUT NO PGEM-T EASY®.

Após a clonagem do gene da proteína de Domínio *Kunitz* no pGEM-T Easy® (Promega) e transformação em *E. coli* DH10B, foram confirmadas a presença do inserto nas colônias brancas, pela PCR, em todas as reações houve a amplificação de um fragmento de aproximadamente 125 pb, coincidindo com o tamanho do gene da proteína BTK-2mut. (Figura 16).

Figura 16 – Eletroforese em gel de agarose a 1% da PCR, para a confirmação da construção da proteína BTK-2mut: (1) marcador de peso molecular de 100pb; (2, 3, 4, 5 e 6) reação da PCR. Ambos corados com GelRed® (Biotium®).



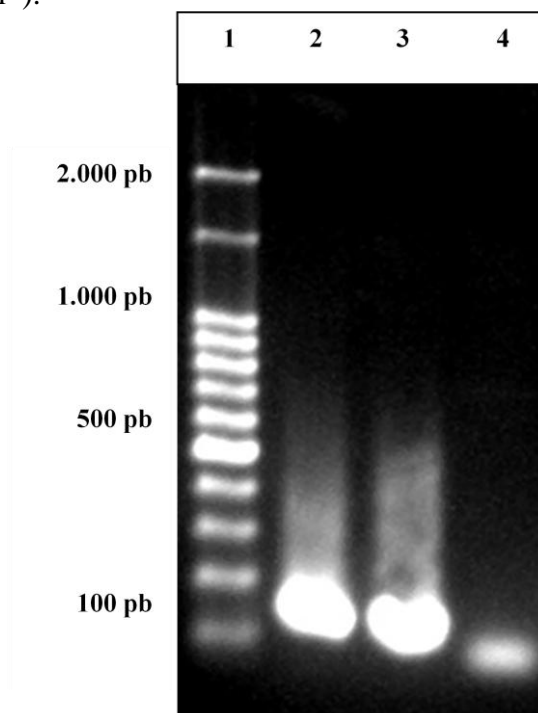
Fonte: produzido pelo autor, 2017.

6.2.1 PCR com várias combinações de primers para a confirmação da proteína de Domínio *Kunitz* BTK-2mut no clone 8 (vetor pGEM-T Easy®).

A presença do gene da proteína BTK-2mut em um dos clones escolhido para os próximos passos (clone 8) foi novamente verificada a partir de reações da PCR utilizando diferentes combinações de iniciadores (P1/P5; P1/P4 e P2/P4), juntamente com o DNA plasmidial do clone 8, utilizado como molde. As reações da PCR

produziram fragmentos de diferentes tamanhos, conforme esperado com as combinações de *primers* utilizados (Figura 17).

Figura 17 – Eletroforese em gel de agarose a 1% da PCR, para a confirmação da construção da proteína BTK-2*mut* no clone 8, utilizando várias combinações de iniciadores para a produção de diferentes tamanhos de amplicons: (1) marcador de peso molecular de 100pb; reações da PCR: (2) P1/P5, (3) P1/P4 e (4) P2/P4. Ambos corados com GelRed® (Biotium®).



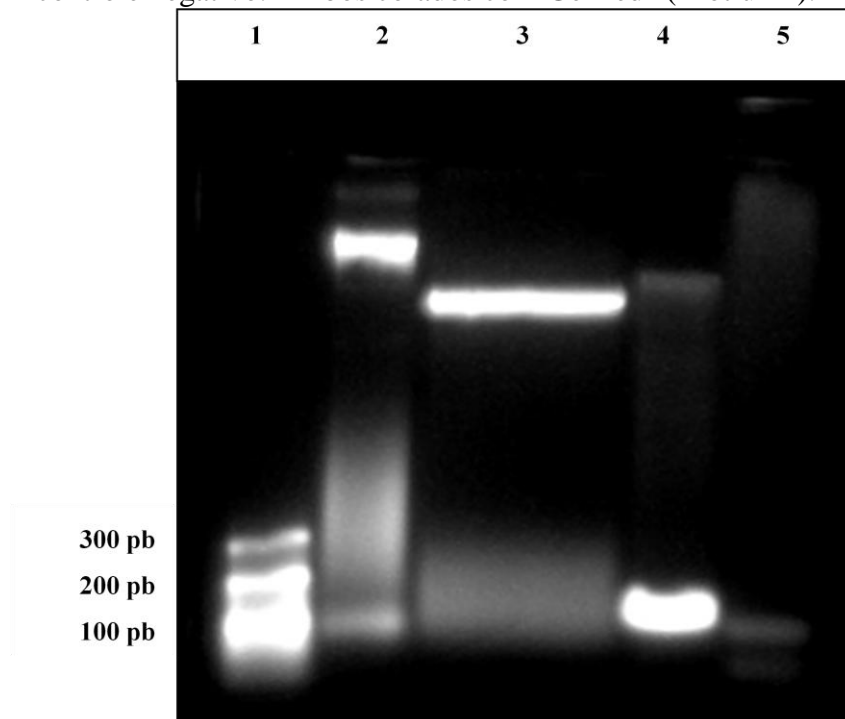
Fonte: produzido pelo autor, 2017.

6.3 CLONAGEM DO GENE DA PROTEÍNA DE DOMÍNIO *KUNITZ* NO FAGOMÍDEO pAPIII6 E MONTAGEM DOS FAGOS.

6.3.1 Digestão do DNA do clone 8 para a recuperação do gene da proteína de Domínio *Kunitz* BTK-2*mut*.

Para a clonagem do gene da proteína de Domínio *Kunitz* BTK-2*mut* no fagomídeo pAPIII6 foi elaborada uma digestão enzimática com as enzimas *Sall* e *HindIII*. A liberação do gene BTK-2*mut* do pGEM-T Easy® após a digestão pode ser visualizada na figura 18.

Figura 18 – Eletroforese em gel de agarose a 1% da digestão com as enzimas *Sall* e *HindIII* para a excisão da banda contendo o gene BTK-2mut: (1) marcador de peso molecular de 20pb; (2) Plasmídeo 8 não digerido, (3) Plasmídeo 8 digerido, (4) PCR do plasmídeo 8 com os iniciadores P1/P5, (5) PCR controle negativo. Ambos corados com GelRed® (Biotium®).

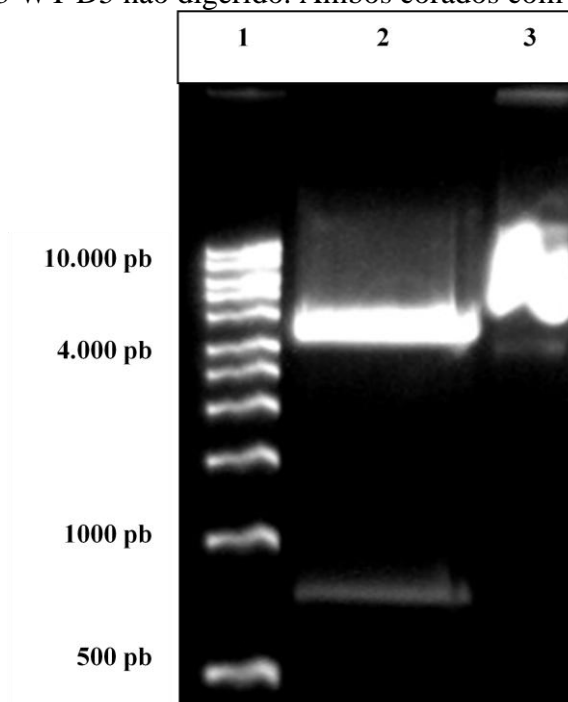


Fonte: produzido pelo autor, 2017.

6.3.2 Digestão do fagomídeo PJH3 WT D5 para a recuperação do vetor pAPIII6.

A digestão enzimática utilizando as enzimas *Sall* e *HindIII* também foi executada com o fagomídeo PJH3 WT D5 para a liberação do gene ScFv D5 do vetor pAPIII6. O vetor pAPIII6 (4.160 pb) sem o gene do anticorpo Anti-HIV foi recuperado do gel e pode ser visualizada na figura 19.

Figura 19 – Eletroforese em gel de agarose a 1% da digestão com as enzimas *Sall* e *HindIII* para a excisão da banda contendo o vetor pAPIII6 sem o gene scfv D5: (1) marcador de massa molecular de 1Kb; (2) PJH3 WT D5 digerido, (3) PJH3 WT D5 não digerido. Ambos corados com GelRed® (Biotium®).



Fonte: produzido pelo autor, 2017.

6.3.3 Avaliação da competência da *E. coli* linhagem XL1Blue eletrocompetente.

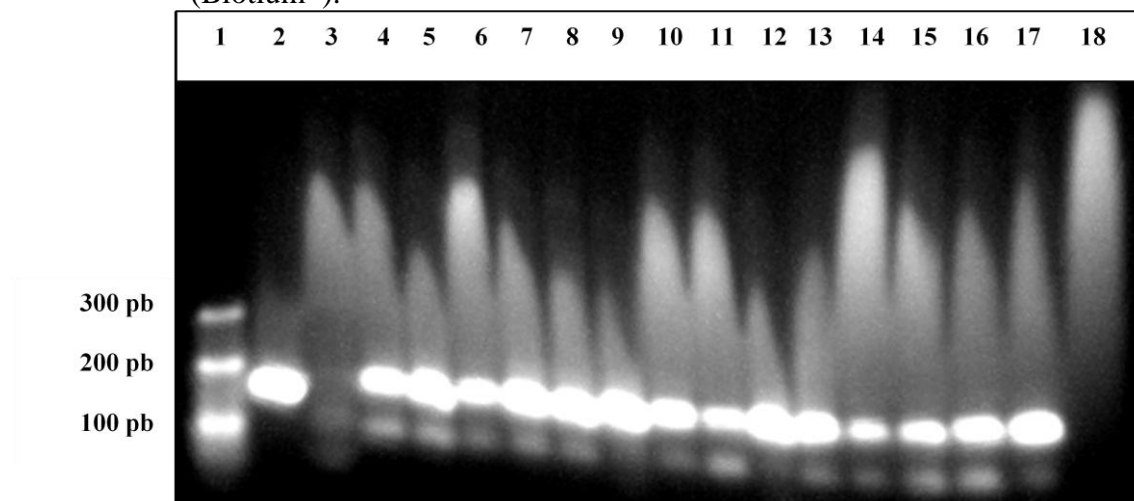
Depois de produzidas, as células eletrocompetentes de *E. coli* linhagem XL1Blue passaram por uma avaliação da eficiência. Uma alíquota de 100 µL de XL1Blue foi transformada por eletroporação, utilizando 10 pg de PUC 19 *control* DNA (Invitrogen®) e semeadas em placas. No dia seguinte foram contadas 07 colônias na placa, portanto, a competência das células foi estimada em 7×10^7 células por µg de plasmídeo.

6.3.4 Confirmação da clonagem do gene da BTK-2mut no pAPIII6.

6.3.4.1 Reação da PCR para triagem de colônias positivas para o gene BTK-2mut.

Após a ligação do vetor pAPIII6 ao gene BTK-2mut e transformação em XL1Blue, dezesseis colônias da placa 1:6 foram testadas pela PCR, destas, 15 colônias amplificaram fragmentos de aproximadamente 125 pb, compatível com o tamanho do gene da proteína de Domínio *Kunitz* BTK-2mut (Figura 20).

Figura 20 – Eletroforese em gel de agarose a 1% da PCR, para a verificação da clonagem do gene proteína BTK-2mut no fagomídeo pAPIII6 utilizando os *primers* P1/P5: (1) marcador de massa molecular de 20pb; (2 a 17) PCR de colônias e (18) controle negativo. Ambos corados com GelRed® (Biotium®).

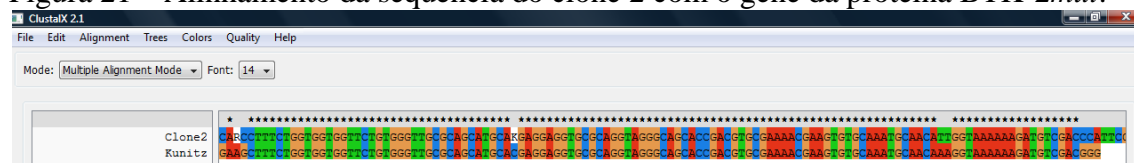


Fonte: produzido pelo autor, 2017.

6.3.4.2 Sequenciamento do clone 2 – BTK-2mut. ligada ao vetor pAPIII6.

O resultado do sequenciamento do clone 2 foi alinhado com a sequência do gene da BTK-2mut, confirmando a clonagem da proteína de Domínio *Kunitz* ao fagomídeo (Figura 21).

Figura 21 – Alinhamento da sequência do clone 2 com o gene da proteína BTK-2^{mut}.

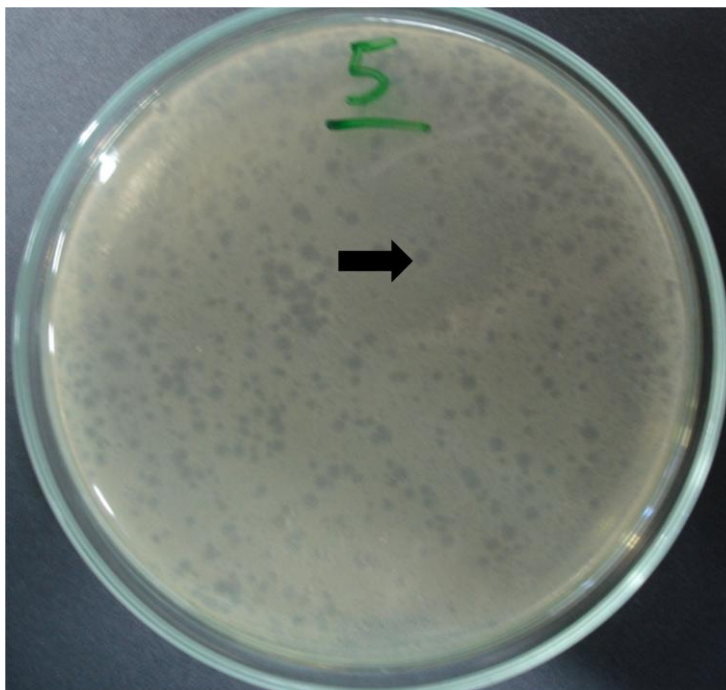


Fonte: produzido pelo autor utilizando o ClustalX[®], 2017.

6.3.5 Titulação do helper phage (M13KO7).

O *helper phage* produzido para ser utilizado na co-infecção da *E. coli* XL1Blue juntamente com o fagomídeo para a produção do fago, foi titulado e semeado em placas de LB com Top Agar. Foram contadas 176 unidades formadoras de placa (UFP) na diluição 10^{-5} , portanto, a quantidade de fagos foi estimada em 2×10^{10} fagos / mL (Figura 22).

Figura 22 – Placa de LB com Top Agar, utilizada para quantificação da produção do *helper phage*. A contagem das UFP (indicado na seta) foi feita na diluição 10^{-5} .

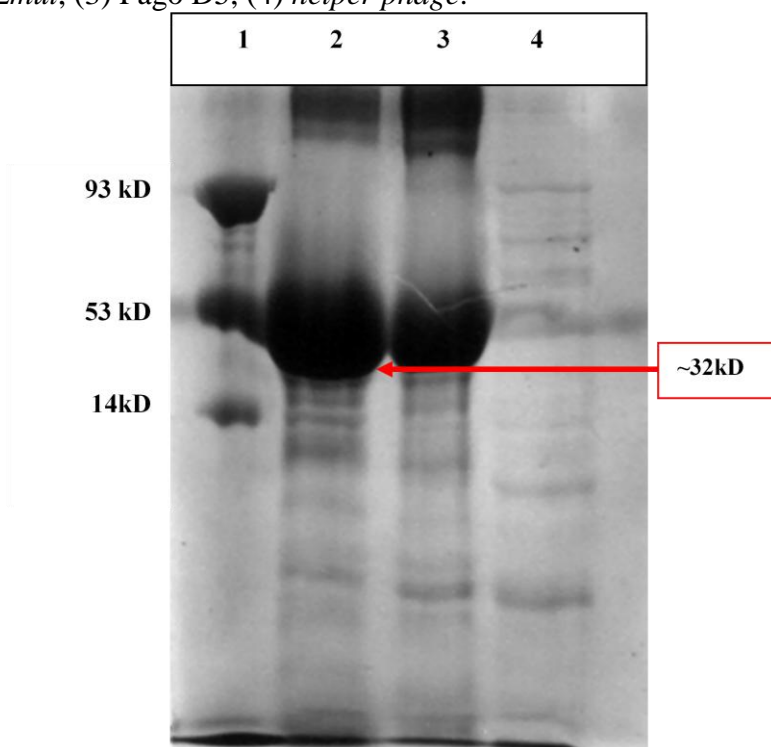


Fonte: produzido pelo autor, 2017.

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 pAPIIK2 para a verificação da expressão da proteína de Domínio Kunitz BTK-2mut.

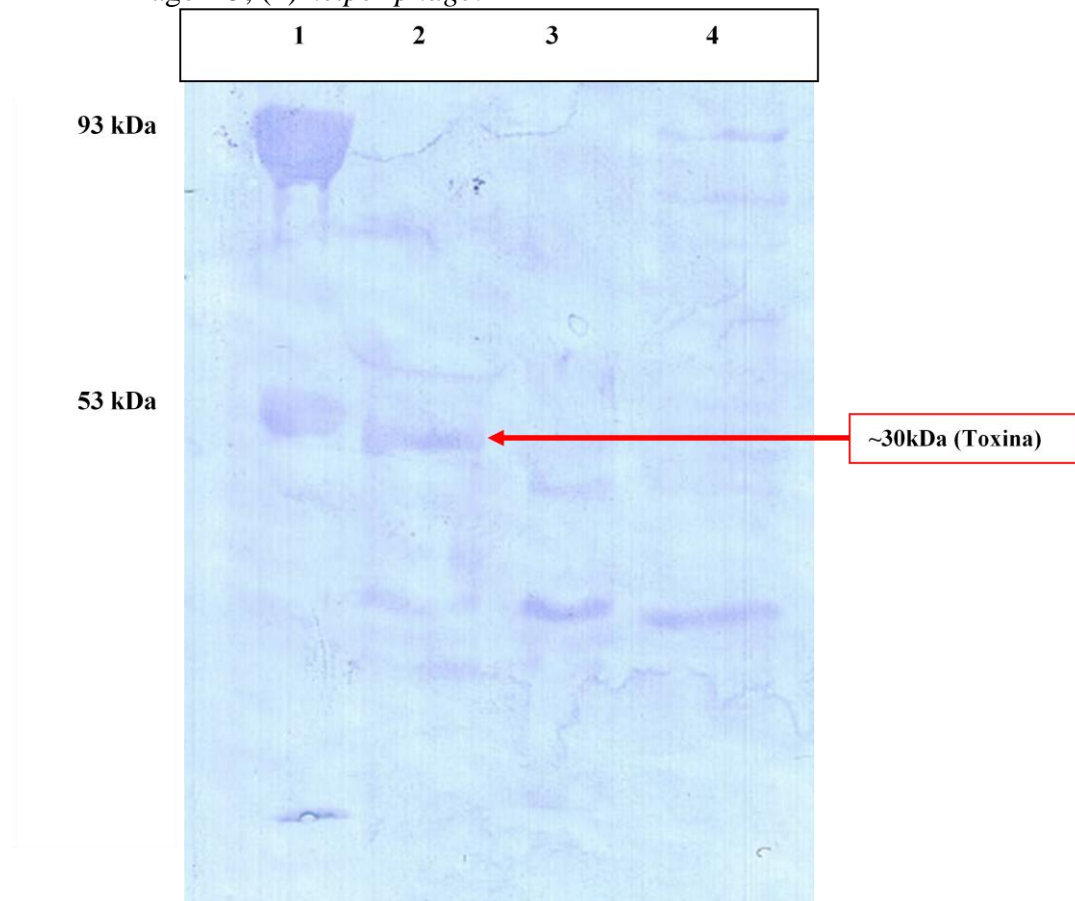
Foi elaborado uma Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em solução desnaturante de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) a técnica de *Western Blotting* para verificar a presença da proteína de tamanho semelhante à BTK-2mut juntamente com a porção C-terminal da pIII. No gel de poliacrilamida, pôde-se observar na canaleta onde foi aplicado o fago produzido a partir do fagomídeo pAPIIK2 proteínas entre aproximadamente 20 a 55 kDa (Figura 23). Na imunolocalização com o *Western Blotting* pôde-se visualizar um fragmento de aproximadamente 32 kDa, tamanho da porção C-terminal da PIII juntamente com a proteína BTK-2mut (Figura 24).

Figura 23 – Eletroforese do Gel de SDS-PAGE de 16%, corados com Coomassie Blue, utilizado para verificação da expressão da proteína junto a PIII do fago: (1) marcador de massa molecular produzido pelo LABHEV; (2) Fago BTK-2mut, (3) Fago D5, (4) *helper phage*.



Fonte: produzido pelo autor, 2017.

Figura 24 – *Western Blotting*, utilizado para verificação da expressão da proteína junto a PIII do fago, por meio da imunolocalização da FLAG na membrana de nitrocelulose: (1) marcador de massa molecular produzido no LABHEV: 93 kDa (KOD), 53 kDa (BGLA) e 14 kDa (Lisozima); (2) Fago BTK-2*mut*; (3) Fago D5; (4) *helper phage*.

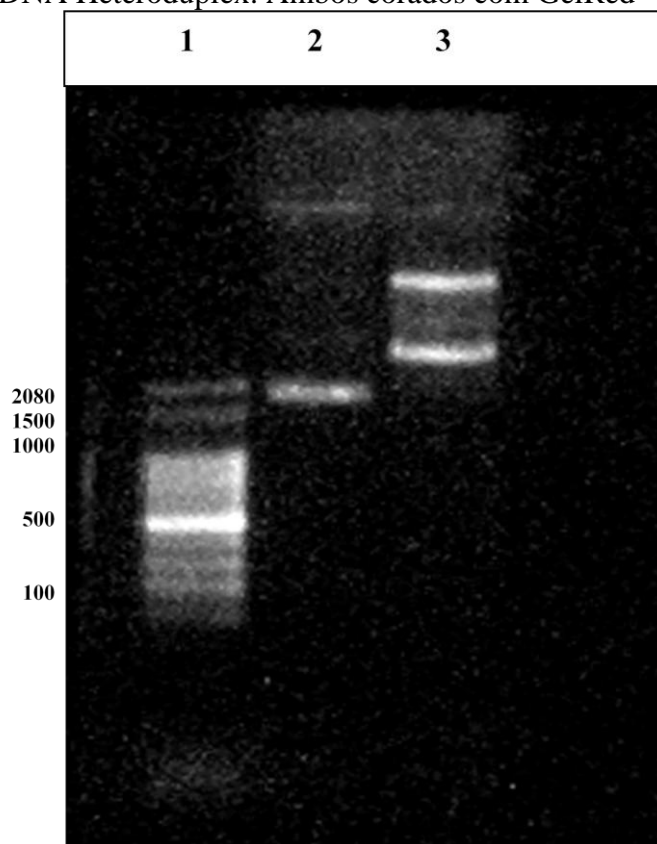


Fonte: produzido pelo autor, 2017.

6.4 KUNKEL MUTAGÊNESE OU MUTAÇÃO SÍTIO DIRIGIDA

Após a execução da reação de *Kunkel*, observou-se que houve a formação do DNA heteroduplex a partir do ss(U)DNA, este pode ser visualizada na canaleta três migrando através do gel de três formas desenrolado, enrolado e super-enrolado (Figura 25).

Figura 25 – Eletroforese em gel de agarose a 1% da reação *Kunkel* mutagênese, utilizada para a montagem da fita de DNA heteroduplex a partir da ss(U)DNA: (1) marcador de massa molecular de 100pb; (2) ss(U)DNA e (3) DNA Heteroduplex. Ambos corados com GelRedTM (Biotium[®]).



Fonte: produzido pelo autor, 2017.

6.4.1 Transformação da biblioteca pAPIIK2-4 em *E. coli* XL1Blue eletrocompetentes.

Após a transformação da biblioteca em XL1Blue por eletroporação e a quantificação dos transformantes depois da titulação (10^{-1} a 10^{-10}), encontrou-se a diversidade total da biblioteca em $5,6 \times 10^6$ transformantes (Figura 26).

Figura 26 – Placa de LB / Amp, utilizada para quantificação da biblioteca pAPIIK2-4. As colônias foram quantificadas na segunda diluição (circulado em vermelho).



Fonte: produzido pelo autor, 2017.

6.4.2 Sequenciamento de clones da biblioteca pAPIIK2 para a verificação da inserção de mutações.

Com o objetivo de verificar a eficácia da inserção das mutações na biblioteca pAPIIK2-4, foram selecionados seis clones da placa de quantificação (Figura 26) para a extração do DNA plasmidial e enviados para o sequenciamento. O resultado das sequencias demonstrou a inserção de mutações nos 6 clones, sendo que, apenas um apresentou códon de parada. Portanto, houve uma alta eficiência de inserção de mutações (Tabela 5).

Tabela 5 – Tradução do sequenciamento de 6 clones para a verificação da inserção de mutações no esqueleto protéico BTK-2*mut* (pAPIIK2) da biblioteca pAPIIK2-4. Em negrito a região de inserções de mutação na α -hélice, e sublinhado a região de inserções de mutação no *loop* menor. O asterisco significa a presença de stop códon.

CLONE	SEQUÊNCIAS
BTK-2 <i>mut</i>	GSVGC AACRRR CAGRAAPTCE <u>NE</u> VCKCNIGKKD
A	GSVGC TD CYKM CAGRAAPTCE <u>AH</u> VCKCNIGKKD
B	GSVGC LNC PFW CAGRAAPTCE <u>Q</u> VCKCNIGKKD
C	GSVGC GTC SFP CAGRAAPTCE <u>I</u> TVCKCNIGKKD
D	GSVGC KRC AHT CAGRAAPTCE <u>VW</u> VCKCNIGKKD
E	GSVGC ALC PGR CAGRAAPTCE <u>VQ</u> VCKCNIGKKD
F	GSVGC TMCN *T CAGRAAPTCE <u>PP</u> VCKCNIGKKD

Fonte: produzido pelo autor utilizando o programa Expasy®, 2017.

6.5 ROUNDS PARA SELEÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* CONTRA *T. evansi*.

6.5.1 Titulação dos fagos recuperados após seleção *in vivo* e *in vitro* contra *T. evansi*.

Os fagos obtidos após três *rounds* de seleção, um *in vivo* e dois *in vitro* foram titulados em placas de LB Agar / Amp juntamente com o *input* utilizado para cada seleção. Para o *round in vivo* ou primeiro *round* o *input* (fagos utilizado para a seleção) foi a biblioteca pAPIIK2-4 inicial inoculada em um camundongo parasitado, sendo o *output* para este *round* os fagos ligantes obtidos da eluição do *T. evansi* após a purificação do parasito do sangue do animal. Após a titulação, o *output* do primeiro *round* foi amplificado para que essa população selecionada pudesse ser utilizada como *input* para o segundo *round* ou primeiro *round in vitro*. A seleção foi finalizada no terceiro *round*, também *in vitro*. Os *rounds in vitro* foram feitos utilizando o método BRASIL. Na tabela 6 seguem os resultados das titulações de cada *round input (in)* e *output (out)*, a relação *in / out* e o fator de enriquecimento da população com afinidade ao *T. evansi*, do primeiro ao terceiro *round*. O fator de enriquecimento demonstra que

houve a evolução da biblioteca contra o *T. evansi*, demonstrado por um acentuado aumento de fagos ligantes, principalmente, no terceiro *round*.

Tabela 6 – Resultados obtidos nos três *rounds* de seleção contra o *T. evansi*.

<i>Rounds</i> <i>Biopanning</i>	<i>Input</i> (ufp/mL)	<i>Output</i> (ufp/mL)	<i>in / out</i> (ufp/mL)	Fator de enriquecimento
1° <i>in vivo</i>	$3,7 \times 10^{11}$	$8,2 \times 10^6$	$4,5 \times 10^5$	1
2° <i>in vitro</i> BRASIL	$5,8 \times 10^{11}$	$1,4 \times 10^8$	$4,1 \times 10^3$	10,8
3° <i>in vitro</i> BRASIL	$1,1 \times 10^{11}$	$5,3 \times 10^8$	2×10^2	217,4

Fonte: produzido pelo autor, 2017.

6.5.2 Titulação dos fagos clones recuperados após o estudo de ligação ao *T. evansi*

Apartir do terceiro e último *round* de seleção contra o *T. evansi*, foram escolhidos aleatoriamente e testados individualmente 6 clones para verificar o potencial de ligação ao parasito, tendo como objetivo avaliar o melhor clone. Após a ligação ao alvo e separação dos fagos não ligantes pelo método BRASIL, fez-se a eluição dos fagos ligantes ao *T. evansi* e titulação dos fagos *input* (10^{-7} a 10^{-12}) e *output* (10^{-1} a 10^{-6}) em LB Agar / Amp. Foram obtidos seguintes resultados conforme a tabela 7. A partir desses resultados o clone 5 demonstrou ser um ótimo candidato possuindo um fator de enriquecimento muito acima do controle, o clone 3 que a partir do sequenciamento, demonstrou possuir a mesma sequência da proteína BTK-2*mut* antes da Kunkel mutagênese (pAPIIK2). Os clones 4 e 6 que apresentaram códons de parada não apresentaram atividade significativa de ligação ao *T. evansi* (dados não incluídos na tabela).

Tabela 7 – Resultados obtidos após o estudo de ligação ao *T. evansi* dos clones 1, 2 e 5, e o clone 3 (sequencia original do Papiiik2) utilizado como controle para calcular o fator de enriquecimento dos clones escolhidos após o terceiro *round* de seleção, utilizando o método BRASIL.

CLONES	Input (ufp/mL)	Output (ufp/mL)	Input / Output (ufp/mL)	Fator de enriquecimento
3	$1,75 \times 10^{11}$	6×10^2	$2,9 \times 10^8$	1
5	$3,15 \times 10^{11}$	$2,7 \times 10^4$	$1,17 \times 10^7$	25
1	$2,14 \times 10^{11}$	$1,1 \times 10^3$	$1,7 \times 10^8$	1,62
2	$1,58 \times 10^{11}$	$4,7 \times 10^2$	$3,3 \times 10^8$	0,86

Fonte: produzido pelo autor, 2017.

6.5.3 Titulação dos fagos clones recuperados após o estudo de ligação ao *T. cruzi* e *T. rangeli*

Com o objetivo de comprovar a especificidade dos clones ao *T. evansi*, após avaliada a eficiência de ligação dos clones escolhidos, os mesmos foram submetidos a um estudo de seleção negativa contra *T. cruzi* e *T. rangeli*, utilizando o método BRASIL. Foram plaqueados em LB / Amp. os *rounds input* (10^{-7} a 10^{-12}) e *output* (10^{-1} a 10^{-6}) de todos os clones para as duas espécies de *Trypanosoma*. Conforme pode ser observado no ensaio com o *T. cruzi*, houve uma pequena ligação (*output*) dos clones um e três (colônias apenas na diluição 10^{-1}), já os clones dois, quatro, cinco e seis não ligaram ao alvo. Na seleção negativa com o *T. rangeli* não houve a ligação de nenhum dos seis clones.

Tabela 8 – Tradução do sequenciamento de 6 clones escolhidos aleatoriamente para os testes de afinidade contra o *T. evansi*. Em negrito a região de inserções de mutação na α -hélice, e sublinhado a região de inserções de mutações no *loop menor*. O asterisco significa a presença de códon de parada.

CLONE	SEQUÊNCIAS
BTK-2 <i>mut</i>	GSVGC AACRRR CAGRAAPTCE <u>NE</u> VCKCNIGKKD
1	GSVGC RHCIIYY CAGRAAPTCE <u>TAV</u> VCKCNIGKKD
2	GSVGC TICLIM CAGRAAPTCER <u>P</u> VCKCNIGKKD
3	GSVGC AACRRR CAGRAAPTCE <u>NE</u> VCKCNIGKKD
4	GSVGC N*CSRG CAGRAAPTCE <u>PA</u> VCKCNIGKKD
5	GSVGC PHCRPR CAGRAAPTCE <u>TGV</u> VCKCNIGKKD
6	GSVGC KTCNYXCX GRAXPXC* <u>HYX</u> VCKCNIGKKX

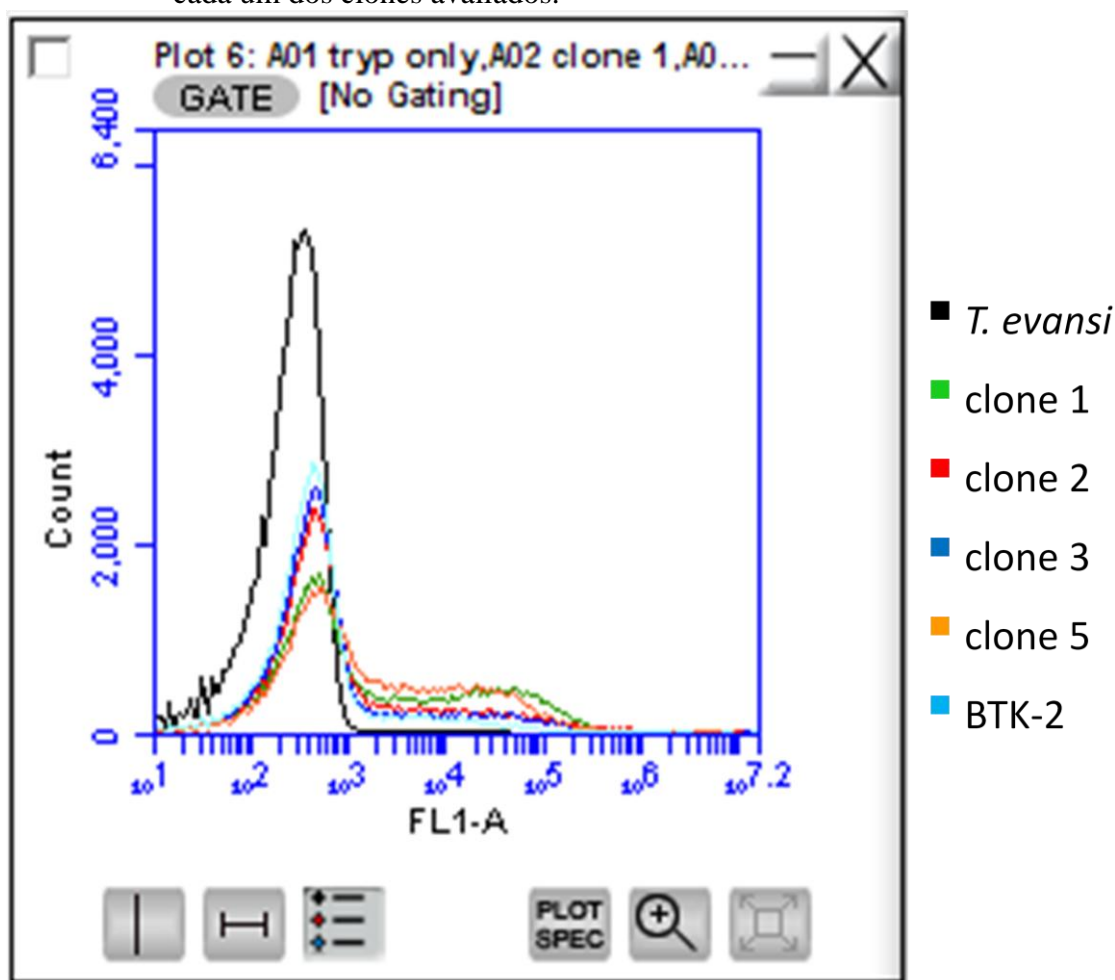
Fonte: produzido pelo autor utilizando o programa Expasy[®], 2017.

6.5.4 Testes qualitativos de eficiência de ligação e do efeito tripanocida contra *T. evansi* dos seis clones, resultados obtidos por meio de citometria de fluxo

6.5.4.1 Eficiência de ligação dos seis clones contra *T. evansi*, marcados com FITC, e analisados por meio de citometria de fluxo.

No gráfico de eventos gerado após a análise da ligação com o *T. evansi* com cada um dos 6 clones e do controle BTK-2*mut* origem, na citometria de fluxo, pôde ser observado que os clones 1 e 5 demonstraram ser mais promissores como ligantes conforme indicado pela fluorescência do FITC. Os clones 4 e 6 que apresentaram códon de parada no sequenciamento, não demonstraram ser bons ligantes nesse teste, portanto, foram retirados do gráfico para a melhor visualização dos demais clones na imagem (Figura 27). Para a captação do FITC, a leitura no citômetro de fluxo foi realizada no canal FL1-A.

Figura 27 – Gráfico gerado na citometria de fluxo com o *T. evansi* tratado com os clones 1, 2, 3, 5 e os controles BTK-2mut e somente o parasito. Quanto mais avança no eixo X, maior é a fluorescência captada do FITC e quanto mais alta é a curva no eixo Y, maior é o número de eventos que representam a parcela de indivíduos marcados com o anti-camundongo marcado com FITC. As legendas ao lado do gráfico indicam a curva de cada um dos clones avaliados.



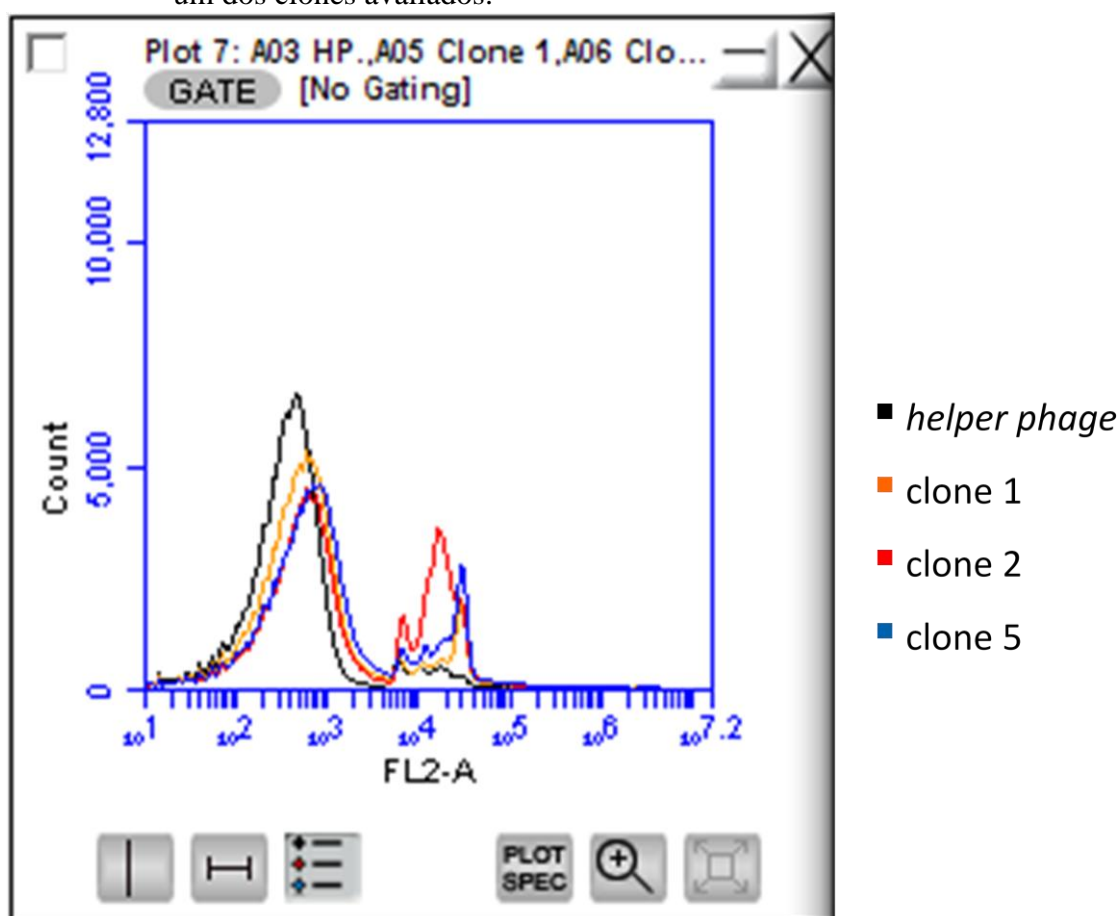
Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

6.5.4.2 Toxicidade de cinco clones contra *T. evansi*, marcados com iodeto de propídio, e analisados por meio de citometria de fluxo.

Os clones 1, 2 e 5 também apresentaram-se como potenciais proteínas tóxicas ao *T. evansi*, conforme a marcação do iodeto de propídio, que consiste em uma sonda fluorescente utilizada para avaliar a integridade da membrana plasmática. Segundo pode ser observado na figura 28. Os clones 3 e 4 foram semelhantes aos controles, não demonstrando ser de caráter tóxico para o parasito (Figura 29). Houve um maior

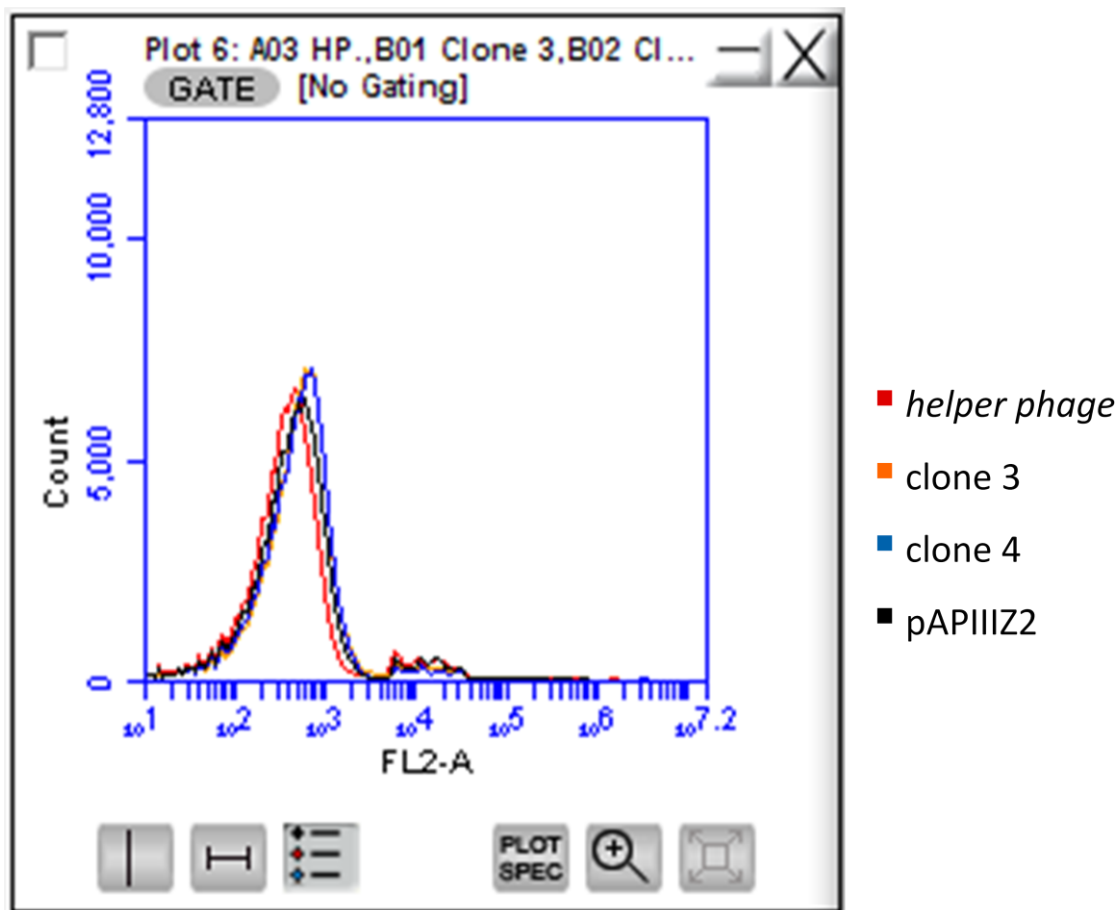
percentual de mortalidade causada pelos clones 1, 2 e 5 quando comparados com os outros clones, com o *T. evansi* sem tratamento, tratado com o *helper phage* e com o pAPIIK2 (Figura 30). Para a captação do FITC, a leitura no citômetro de fluxo foi realizada no canal FL2-A.

Figura 28 – Gráfico gerado na citometria de fluxo com o *T. evansi* tratado com os clones 1, 2 e 5 e o *helper phage* (controle). Quanto mais avança no eixo X, maior é a fluorescência captada do iodeto de propídio (sonda para identificação de células mortas). A curva no eixo Y indica o número de eventos ocorridos. As legendas ao lado do gráfico indicam a curva de cada um dos clones avaliados.



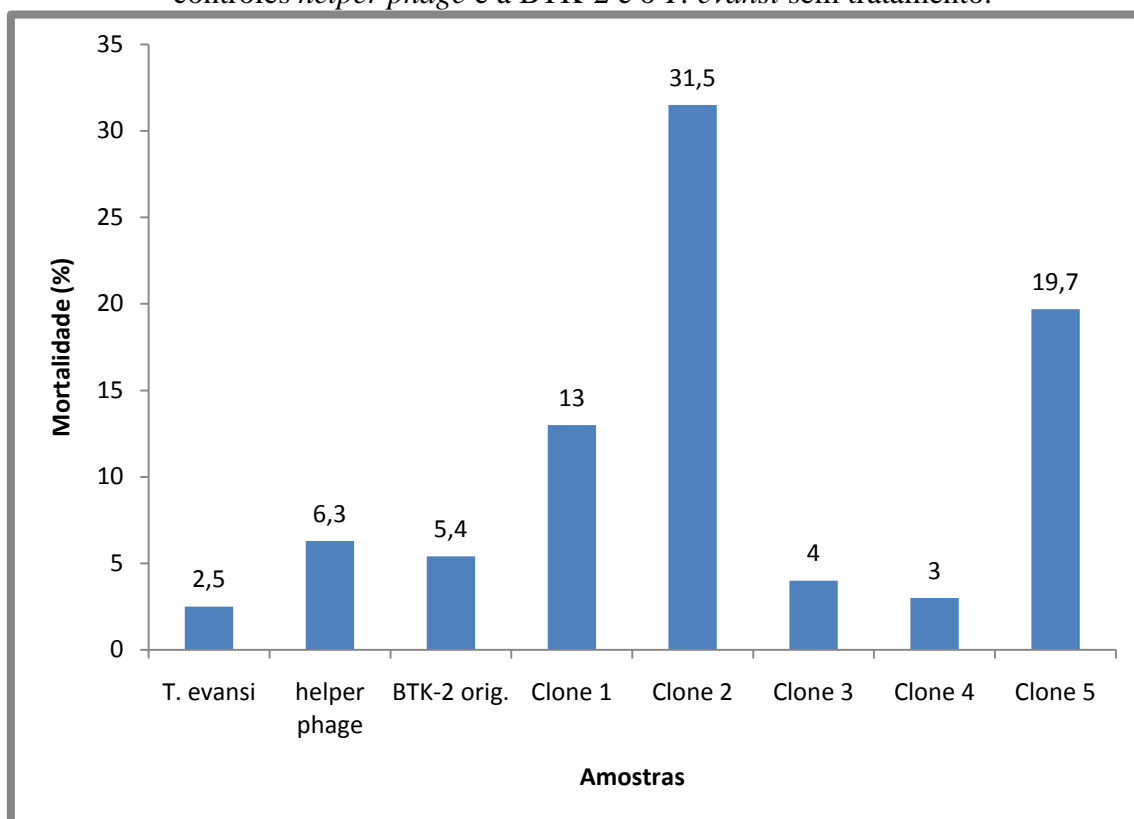
Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Figura 29 – Gráfico gerado na citometria de fluxo com o *T. evansi* tratado com os clones 3 e 4 e o *helper phage* e a BTK-2 como controles. Quanto mais avança no eixo X, maior é a fluorescência captada do iodeto de propídio (sonda para identificação de células mortas). A curva no eixo Y indica o número de eventos ocorridos. As legendas ao lado do gráfico indicam a curva de cada um dos clones avaliados.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Figura 30 – Gráfico gerado a partir dos dados obtidos na citometria de fluxo com a utilização do iodeto de propídio para a identificação dos *T. evansi* mortos após o tratamento com os clones 1, 2, 3, 4 e 5. Tratamento com os controles *helper phage* e a BTK-2 e o *T. evansi* sem tratamento.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

7 DISCUSSÃO

A tripanossomose causada pelo *T. evansi* é uma enfermidade de grande importância em sistemas produtivos que utilizam equinos, sendo essa espécie mais sensível à enfermidade, porém, trata-se de um parasito eurixeno. Infecções em humanos tem sido descritas (JOSHI et al., 2005), relacionadas a falhas na produção da APOL-I pelo hospedeiro, proteína que possui atividade tripanolítica (VANHOLLEBEKE et al., 2006), mas também em um indivíduo que produzia níveis normais da proteína (CHAU et al., 2016), demonstrando o caráter zoonótico desse parasito.

A técnica de *phage display* tem sido amplamente utilizada na descoberta de novos marcadores para testes diagnósticos e no estudo de interação proteína-proteína com o objetivo encontrar novas moléculas bioativas que possam gerar novas drogas ou marcadores para diagnóstico. Trata-se de uma técnica que está em franca expansão e que poderá trazer muitos avanços nas áreas de diagnóstico e na terapêutica dentro da medicina veterinária.

Com o objetivo de pesquisar interações peptídicas que possam servir de base para o desenvolvimento de marcadores específicos para o *T. evansi* e até mesmo que possam ser utilizadas para o desenvolvimento de novas drogas foi desenvolvido um novo esqueleto protéico para apresentação em bibliotecas de *phage display*, utilizando o peptídeo BTK-2 de Domínio *Kunitz* de 32 aminoácidos e massa de 3,4 kDa, encontrado na toxina da peçonha do escorpião vermelho indiano, *Mesobuthus tamulus*, que bloqueiam canais de potássio humano (hKv1.1) (DHAWAN et al., 2003).

Bibliotecas de *phage display* engenhadas para a apresentação de anticorpos têm sido utilizadas por outros pesquisadores para encontrar alvos contra *Trypanosomas* spp. africanos com o propósito de encontrar novos possíveis marcadores para diagnóstico e mesmo para o desenvolvimento de novas terapias (STIJLEMANS et al., 2004; OBISHAKIN et al., 2014; ODONGO et al., 2016). Bibliotecas comerciais de peptídeos lineares também têm sido utilizadas na busca de ligantes contra anticorpos monoclonais anti-*T. brucei* (NIEUWENHOVE et al., 2011).

A biblioteca desenvolvida com a proteína BTK-2 possui algumas vantagens com relação às bibliotecas comerciais de peptídeos lineares. O esqueleto peptídico de Domínio *Kunitz*, possui dois *loops* expostos, duas folhas- β e uma α -hélice. Essa

estrutura torna-se estável pela presença de três pontes de dissulfeto, e permitem que sejam feitas múltiplas substituições de aminoácidos (HOSSE et al., 2006; ZOLLER et al. 2011). São resistentes a enzimas, a um grau elevado de modificações químicas e estáveis a várias temperaturas (ZOLLER et al. 2011).

A biblioteca pAPIIK2-4, gerada a partir da toxina BTK-2 nesse estudo obteve uma variabilidade de $5,6 \times 10^6$. Zhao et al. (2004) construíram uma biblioteca com um esqueleto semelhante ao BTK-2, utilizando uma proteína de Domínio *Kunitz*, derivado da Defensina A de insetos, com 29 aminoácidos, foram feitas randomizações em sete posições, localizadas dentro dos dois *loops*. A biblioteca gerada possuía uma variedade teórica de $8,3 \times 10^8$ transformantes. Com essa biblioteca foram encontrados ligantes com alta afinidade ao TNF (ZHAO et al., 2004). ZHAO et al. (2015) desenvolveram uma biblioteca de toxinas bloqueadoras de canais de K^+ a partir do esqueleto SAK1 (toxina do veneno da anêmona do mar), essa biblioteca apresentou uma variabilidade teórica de $1,5 \times 10^6$.

A proteína de Domínio *Kunitz* BTK-2 possui uma elevada carga positiva, indicando que esse peptídeo é tóxico (DHAWAN et al., 2003). A BTK-2mut. foi construída por *overlapping* de 5 *primers*. Para torná-la atóxica, esses iniciadores foram desenhados de modo que fossem adicionadas argininas no lugar dos aminoácidos valina (V)₃; glicina (G)₄; alanina (A)₆, glutamina (E)₇; prolina (P)₉; metionina (M)₁₀ e histidina (H)₁₁ que formam a α -hélice.

A proteína de Domínio *Kunitz* BTK-2 é menos complexa que anticorpos, característica que facilita a produção e diminui o custo para a obtenção. Possui algumas vantagens em suas propriedades farmacocinéticas quando comparado com bibliotecas de anticorpos, como por exemplo, a rápida acumulação na região de interesse; rápida passagem pelos compartimentos não específicos. Portanto mimetizam anticorpos, porém, com a vantagem de serem menos imunogênicas, diminuindo efeitos colaterais (HOSSE et al., 2006; ZOLLER et al. 2011).

No *Western blotting* utilizado para verificar se o fago montado com a proteína BTK-2mut ligado a pIII estaria sendo corretamente apresentado, pôde ser observado com o uso de um anticorpo anti-FLAG e com um anticorpo anti-camundongo contendo fosfatase alcalina, uma proteína de aproximadamente 30 kDa próximo dos 32 kDa da BTK-2mut (Figura 26). LAROCCA et al. (2001) demonstraram a produção de um fago funcional no *Western blotting*, em uma biblioteca que foi desenhada para apresentar o

Fator de Crescimento Epidérmico fusionado a porção C-terminal da pIII. Essa proteína quimérica apresentou aproximadamente 38 kDa no *Western blotting* marcado com um anticorpo anti-pIII. Faix et al. (2004) demonstrou que uma pIII truncada de uma biblioteca de cDNA apresentando proteínas produzidas a partir de fragmentos de 150 a 350 pb possuíam entre 30 a 32 kDa.

Nesse estudo, para a montagem dos fagos, foi utilizado a co-infecção do fagomídeo contendo o gene da proteína BTK-2mut com o *helper phage* (M13KO7) e no SDS-PAGE pode ser observado uma grande quantidade de proteínas acima de 50 kDa (Figura 25). Quando comparado com a pIII apresentando a proteína BTK-2mut (≈ 30 kDa) marcada com anti-FLAG no *Western blotting* (Figura 26), o SDS-PAGE, demonstra que há uma grande quantidade de pIII nativas, não apresentando a BTK-2mut nos fagos pAPIIK2-4. O resultado apresentado no SDS-PAGE, demonstrando uma grande quantidade de pIII nativa, leva a crer que uma grande parcela dos fagos produzidos pode não estar apresentando a BTK-2mut ligada a pIII, e isso pode ter prejudicado, levando a uma menor eficiência dos *rounds* de ligação durante a evolução da biblioteca para encontrar o melhor candidato com afinidade ao *T. evansi*. Segundo Rondot et al. (2001) a utilização de um *helper phage* com o gene da pIII deletado poderia aumentar em até 400 vezes a potência da biblioteca, por favorecer a montagem de fagos com a pIII mutante. Utilizando essa abordagem, Larocca et al. (2001) defendem os benefícios do uso de fagos multivalentes, que expressam mais de uma pIII quimérica e que pode aumentar a potência da biblioteca para ligação ao alvo. No entanto, a desvantagem da utilização do sistema de apresentação com fagos multivalentes é que esses levam a uma seleção por avidéz, enquanto que no sistema que utilizamos (monovalente) os alvos são selecionados por afinidade (HUANG et al., 2012).

A diversidade e o tamanho da biblioteca estão diretamente ligados a capacidade de sucesso em encontrar peptídeos ligantes contra alvos, pois, apenas uma fração dos fagos se apresentará viável, sem códon de parada (ROSANDER et al. 2003). Apesar da grande incorporação de mutações obtida pela técnica de Amplificação por Círculo de Rolagem Seletivo (RCA), a falta de uma ótima competência das células eletrocompetentes, utilizadas na transformação permitiu a geração de uma biblioteca de $5,6 \times 10^6$ transformantes.

Segundo Breitling et al. (2010) menos que 1 % dos fagos produzidos a partir da co-infecção do fagomídeo com o *helper phage* (M13KO7) carregam a proteína exógena

ligada a pIII. Sendo que a grande maioria dos descendentes possui apenas a pIII selvagem por ser favorecida durante a montagem do fago no método que utiliza a co-infecção com o *helper phage*. O tamanho da biblioteca ($5,6 \times 10^6$) não foi suficiente para cobrir toda a diversidade teórica inserida pelos *primers* degenerados no gene da BTK-2*mut* ($1,2 \times 10^9$). No entanto, bibliotecas de alta diversidade teórica que utilizam sistemas de produção de fagos baseado no *helper phage*, que contém o gene da pIII para a montagem dos fagos, apresenta uma grande produção de fagos montados com a pIII selvagem. Isso significa que durante uma seleção contra o alvo, apenas algumas centenas de cópias de um determinado ligante estarão sendo apresentados por fagos (BREITLING et al., 2010), sendo essa uma desvantagem das bibliotecas com alta diversidade, pois muitas vezes não é possível explorar totalmente o potencial dessas bibliotecas.

As mutações foram direcionadas para o *loop* menor que pode interagir com estruturas como canais e poros, e na α -hélice que conforme ocorre com a BTK-2, interage fortemente com canais de potássio (DHAWAN et al., 2003).

A primeira biblioteca de *phage display* que montamos a partir do esqueleto BTK-2 foi mutagenizada utilizando a técnica de *Kunkel* mutagênese, onde, após a construção da heteroduplex uracilada, esta foi transformada em *E. coli* XL1Blue para a destruição do DNA selvagem, utilizado como molde, que sofreu incorporações de uridina durante o crescimento em *E. coli* CJ236. Após o sequenciamento foi observado que o número de mutantes foi inferior a 50%. Portanto, para corrigir a baixa produção de mutantes, foi utilizada a técnica de Amplificação por Círculo Rolante Seletivo do produto da *Kunkel* Mutagênese (HUOVINEN et al., 2012).

O sequenciamento de clones para avaliar a diversidade da biblioteca comprovou que a inserção de mutações no *loop* menor e na α -hélice ocorreu em 100% dos clones avaliados. Huovinen et al. (2012) após a utilização do método de Amplificação por Círculo Rolante Seletivo também obtiveram inserções em 100% dos clones.

A seleção *in vivo* é muito mais adstringente e tem-se demonstrado sucesso com essa técnica para busca de ligantes a alvos *in vivo* (HAJITOU et al., 2006; KOLONIN et al., 2006). A seleção das proteínas ligantes, provenientes dos clone 1, 2 e 5, foram obtidas por meio de três *rounds* utilizando a biblioteca de *phage display* pAPIIK2-4 contra *T. evansi*, sendo o primeiro *in vivo*, com os fagos capturados após 20 min. de ligação com o hemoparasito, após a aplicação da biblioteca por via intravenosa em um

camundongo infectado. A captura dos fagos ligantes, a partir dos *Trypanosomas* purificados do sangue do animal infectado, demonstrou a capacidade dessa biblioteca de atingir alvos específicos em modelos experimentais *in vivo*.

O clone 5, selecionado a partir do terceiro *round* utilizando a biblioteca pAPIIK2-4 demonstrou ser 25 vezes mais potente para ligação ao *T. evansi* que o clone 3 que também foi selecionado a partir do terceiro *round*, e que após o sequenciamento observou-se tratar da mesma sequência apresentada pelo fagomídeo pAPIIK2, origem da biblioteca, sendo portanto, utilizado como controle para os cálculos de enriquecimento. ZHAO et al. (2015), após 5 *rounds* selecionaram dois peptídeos: Hui1, um mutante com alta afinidade aos canais de K⁺. Também houve o enriquecimento de um fago contendo uma toxina nativa.

O sequenciamento do clone 5 demonstrou que houve a inserção dos seguintes aminoácidos, na α -hélice prolina (P)₄; histidina (H)₅ e prolina (P)₈, e no *loop* menor treonina (T)₂₀ e glicina (G)₂₁.

Tomando como base a ligação das proteínas da família α -KTx a qual pertence a proteína BTK-2. A exposição do aminoácido lisina (L)₂₅ e o bloqueio causado pela prolina (P)₈ no canal de potássio, podem ser os principais aminoácidos envolvidos na ligação dessa proteína ao canal hKv1.1 (DHAWAN et al., 2003).

Tripanossomatídeos como *T. cruzi* e a *Crithidia fasciculata* possuem um canal de K⁺ ligado a produção de ATP na membrana da mitocôndria. Quando ativado pelo K⁺, aumenta o volume da mitocôndria e desencadeia a formação da cadeia respiratória, importante para a produção de energia para o parasito. O bloqueio do canal pelo 5-Hydroxydecanoato (5-HD) diminui os níveis de ATP e estimula a produção de oxigênio reativo deletério (COSTA; KRIEGER, 2009). As inserções de prolina (P)_{4,8} na α -hélice do clone 5 podem ter aumentado a afinidade ao canal de K⁺ do *T. evansi* e caso o mesmo canal de K⁺ ligado ao ATP existir e realmente for o alvo do clone 5, é possível que ocorra uma interferência na cadeia respiratória do parasito, se isso for confirmado, esse fato pode ser a causa da toxicidade em *T. evansi* tratados com o fago apresentando a proteína 5. Segundo Costa e Krieger (2009) o canal de K⁺ ligado a produção de ATP parece ser estruturalmente diferente do encontrado em mamíferos o que torna um alvo potencial para o desenvolvimento de novas drogas.

O gene responsável pela formação do canal de K⁺ identificado em *T. brucei* é o TbHKT1 que é ortólogo em outros tripanossomatídeos, *T. cruzi* possui dois alelos

idênticos e *T. vivax* um alelo idêntico e em *Leishmania* spp. são encontrados vários alelos idênticos (MOSIMANN et al., 2010).

Mosimann et al. (2010) não obtiveram sucesso para elucidar a importância desse tipo de canal de K^+ para *T. brucei*. Durante a evolução muitos eucariotos perderam esse tipo de canal, no entanto, permanece nos tripanosomatídeos e, portanto, acredita-se que possuem uma função indispensável no ciclo de vida desses parasitos.

T. brucei foi insensível ao bloqueio do canal de K^+ com tetraetilamonio e toleraram o bloqueio com a charybdotoxina (MOSIMANN et al., 2010), toxina de escorpião que possui afinidade com canais de K^+ tipo hkv1.3 (NIKOUÉE et al., 2012). A proteína BTK-2 diferentemente da charybtoxina, possui afinidade por canais de K^+ tipo hkv1.1 (DHAWAN et al., 2003), portanto, o fato de não ocorrer o bloqueio do canal de K^+ com a charibtoxina é inconclusivo para a toxina BTK-2.

Inicialmente os clones foram testados qualitativamente, em um estudo de quantificação em placa após o método BRASIL e em outro estudo utilizando a citometria de fluxo, sem replicatas.

No método BRASIL, o clone 5 demonstrou possuir alta afinidade ao *T. evansi*, mas não demonstrou afinidade ao *T. cruzi* e *T. rangeli*, conforme demonstrado nos ensaios de placa, ou seja, provou ser um candidato potencial para o desenvolvimento de um marcador para ser utilizado em testes diagnósticos de *T. evansi*. Nos ensaios de citometria de fluxo utilizando a marcação dos fagos com FITC, os resultados obtidos demonstram que além do clone 5, o clone 1 sobressai-se dos demais quanto ao potencial de ligação.

Estudos utilizando bibliotecas comerciais de *phage display* com outras espécies da família Tripanosomatidae como, por exemplo, *Leishmania* spp. tem sido elaborados. Costa et al. (2014) identificaram mimetopos contra *Leishmania infantum* utilizando uma biblioteca comercial de peptídeos lineares. Esses peptídeos foram testados com sucesso como marcadores para sorodiagnóstico contra *Leishmania* visceral canina e humana (COSTA et al., 2017).

Nieuwenhove et al., (2011) utilizaram bibliotecas de *phage display* de peptídeos lineares e encontraram mimetopos ligantes aos anticorpos LiTat1.3 e LiTat1.5 (anti-VSGs) e validaram para a utilização em teste diagnóstico indireto contra *T. brucei gambiense*.

Anticorpos encontrados com o uso de bibliotecas de *phage display* também demonstraram capacidade de detecção de *Trypanosomas* spp. Segundo Obishakin et al., (2014) o nanoanticorpo Nb392 produzido a partir de linfócitos T de animais infectados com *T. evansi* foi capaz de detectar também *T. brucei*, *T. congolense* e *T. vivax*. O nanoanticorpo Nb474 produzido a partir dos linfócitos T de animais imunizados contra *T. congolense* foi utilizado em um diagnóstico ELISA tipo *sandwich*, foi testado contra amostras de *T. congolense*, *T. brucei*; *T. evansi* e *T. vivax*, e obtiveram uma especificidade de 94% e sensibilidade de 87% (ODONGO et al., 2016).

Apartir dos ensaios utilizando o método BRASIL e a citometria de fluxo, o clone 5 demonstrou possuir uma alta afinidade e poderá vir a ser utilizado para o desenvolvimento de novos testes de diagnóstico direto para *T. evansi*.

Testes de diagnóstico direto para a pesquisa do antígeno possuem como vantagem em relação aos testes indiretos, a possibilidade de verificar a situação de animais pré, durante e pós-tratamento. Sendo possível avaliar a progressão ou declínio da infecção pelo *T. evansi*. Exames indiretos, embasados na captura de anticorpos específicos produzidos pelo hospedeiro para o controle da infecção, podem falhar no reconhecimento da infecção por algumas cepas (NGAIRA et al., 2005), e não ser um bom indício da progressão da infecção, pois as imunoglobulinas podem permanecer durante meses e até anos após a eliminação da infecção pelo tratamento (BÜSCHER et al., 2014).

No ensaio de citometria, utilizando o iodeto de propídio como sonda de mortalidade celular, os clones 2, 5 e 1 demonstraram toxicidade contra o *T. evansi*. Stijlemans et al., (2004) utilizaram o nanoanticorpo An33 para carrear a enzima β -lactamase, utilizada como uma pró-droga contra o *T. brucei*. Esse mesmo nanoanticorpo demonstrou, por si só, ter atividade lítica contra o *T. brucei* (STIJLEMANS et al., 2011).

O clone 5 demonstrou possuir um efeito diretamente proporcional entre ligação e toxicidade, ou seja, esse peptídeo apresentou o maior potencial de ligação, conforme verificado nos testes de ligação, quantificados em placa, e foi um dos mais tóxicos para os parasitos. O clone 2 foi o terceiro melhor ligante dentre os clones em quantificação em placas, porém, abaixo do obtido com o clone 3 (controle), também não pode ser observado uma boa eficiência de ligação no ensaio de citometria com o FITC, porém, apresentou-se como o clone com maior efeito citotóxico. O clone 1 foi o segundo

melhor clone em afinidade ao alvo nas quantificações em placa, porém, equivalente ao clone 5 quando avaliada sua afinidade ao *T. evansi* por meio de citometria de fluxo utilizando o FITC, também apresentou um potencial efeito tóxico contra o parasito.

Devido ao fato de avaliarmos os *rounds* de ligação por meio de infecção de *E. coli* XL1Blue com a posterior contagem dos *rounds input* e *output* em placas e os custos com sequenciamentos, não foram estudados um número elevado de clones, sendo limitado a apenas seis, no entanto, o clone 5 demonstrou um aumento significativo no potencial de ligação, observado tanto na quantificação em placa quanto na citometria de fluxo. ZHAO et al. (2015) sequenciaram 170 colônias para encontrar um ligante de alta afinidade a canais de K⁺.

8 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A construção e mutação sítio direcionada da biblioteca de *phage display* pAPIIK2-4 a partir da toxina BTK-2 foi validada e os sequenciamentos dos clones demonstraram uma taxa de inserção de mutações próximo a 100%.

Dentre os clones analisados o 1 e 5 apresentaram maior afinidade de ligação ao *T. evansi*, tanto no método BRASIL como na citometria de fluxo, em especial o clone 5.

Os clones 1, 2 e 5 apresentaram maior toxicidade para o *T. evansi*. Porém, ao contrário dos clones 1 e 5, o clone 2 não demonstrou possuir grande afinidade, no entanto, esse clone apresentou a maior toxicidade dentre os clones avaliados.

O clone 5 demonstrou ser o clone mais promissor, possuindo alta afinidade ao alvo, não possuindo afinidade ao *T. cruzi* e *T. rangeli*. Como perspectiva, pretendemos avançar os estudos desse clone com ensaios de ligação contra o *T. evansi* para análises quantitativas do potencial de ligação dessa proteína, também, pretendemos elaborar novas seleções negativas, em especial, com o *T. brucei*, para enfim validá-lo como um marcador específico de alta sensibilidade e especificidade.

Após a produção dos peptídeos dos clones 2 e 5, separados do fago, pretendemos avaliar a atividade tóxica contra o *T. evansi*, utilizando vários gradientes de concentração e tempos diferentes de exposição para a melhor avaliação do potencial tóxico de cada proteína.

Com os peptídeos 2 e 5 isolados também serão elaborados testes de localização para a ligação a extratos protéicos do *T. evansi*, obtidos após ultracentrifugação, tendo como objetivo identificar a região onde ocorre a interação das proteínas 2 e 5 com o *T. evansi*.

Como projeto futuro para a melhoria da biblioteca pAPIIK2-4, pretendemos inserir mais mutações na região do *loop* maior da proteína BTK-2 e mapear a região de interação das proteínas 2 e 5 ao *T. evansi*, através da inserção de mutações nos possíveis locais de ligação desses clones ao parasito. Após pretendemos evoluir os clones iniciais 2 e 5, inserindo mutações na proteína em regiões fora dos locais de interação da proteína com o parasito, e finalmente submeter essas novas bibliotecas a novos *rounds* de seleção contra o *T. evansi*, com o objetivo de encontrar ligantes mais potentes.

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 trypanosomiasis 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.

NIKOUUEE, 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.