



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Instituto de Ciências Biológicas**

**Programa de Pós-Graduação em Parasitologia**



**Potencial de vacinas de carboidratos  $\alpha$ Gal e  
raminose, acoplados a partículas virais-like  
( $Q\beta$ - $\alpha$ Gal/Rham) na doença de Chagas**

**Maíra Araújo Azevedo**

Belo Horizonte, MG

Maio/2018

Maíra Araújo Azevedo

**Potencial de vacinas de carboidratos  $\alpha$ Gal e  
raminose, acoplados a partículas virais-like  
( $Q\beta$ - $\alpha$ Gal/Rham) na doença de Chagas**

Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências/Parasitologia.

Área de concentração: **Protozoologia**

Orientador: **Dr. Alexandre Ferreira Marques**

Co-Orientador: **Dr. Ricardo Toshio Fujiwara**

Laboratório de Imunoproteoma e Biologia de Parasitos

Belo Horizonte, MG

2018

Esta tese foi desenvolvida no Laboratório de Imunoproteoma e Biologia de Parasitos do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG, sob a orientação do Professor Dr. Alexandre Ferreira Marques e co-orientação do Dr. Ricardo Toshio Fujiwara – UFMG

**Apoio Financeiro:**



## **COLABORADORES:**

### **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG**

#### **Departamento de Parasitologia**

#### *Laboratório de Imunoproteoma e Biologia de Parasitos*

Gisele Macêdo Rodrigues da Cunha

#### *Laboratório de Biologia do *T. cruzi* e doença de Chagas*

Prof. Dr. Egler Chiari

Profa. Dra. Lúcia Galvão

#### *Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos*

Dr Fabrício Marcus Silva Oliveira



### **GEORGIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY**

#### **School of Chemistry and Biochemistry**

Dr. M. G. Finn

Dr. Carlos A. Sanhueza

Robert Hincapie



### **FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ**

#### **Centro de Pesquisas René Rachou**

Prof. Dr. Ricardo Gazzinelli



“Todo caminho é resvaloso. Mas cair não prejudica demais...

A gente levanta, a gente sobe, a gente volta...

O correr da vida é assim: esquentada e esfria, apertada e aí afrouxa.

Sossega e depois desinquieta

O que ela quer da gente é a coragem!”

JOÃO GUIMARÃES ROSA

*A Deus,*

*Pois quando mais precisei, Ele sempre esteve comigo,*

*“Tudo posso naquele que me fortalece...”*

*A minha vó **Maria**, companheira e amiga eterna,*

*“Enquanto eu respirar vou me lembrar de você”*

*Aos meus pais, **Jacqueline e Sávio**,*

*Carinho, compreensão, companheirismo e incentivo em minhas escolhas, além de princípios e valores, educação que vai muito além dos livros.*

*Amo vocês!*

*Ao **Gilson**,*

*Pelos conselhos e carinhos sempre presentes.*

*Ao meu irmão **Rafael**,*

*Meu porto seguro e certeza de amor eterno*

*Obrigada por ter tamanha importância na minha vida.*

*As minhas irmãs **Beatriz e Sophia**,*

*Mesmo longe, nossos laços são mais fortes que tudo.*

*“As mais lindas de todas as lindas...”*

*A minha **família**,*

*Em especial tias **Denise e Tânia**, sempre presentes em todos os momentos da minha jornada*

*Obrigada por sempre me apoiarem e darem força para continuar esta caminhada*

***Obrigada a todos que direta ou indiretamente ajudaram a fazer desse sonho uma realidade!!!***

## AGRADECIMENTO

Meu orientador **Alexandre Marques**, por abrir as portas do laboratório e apresentar novos horizontes

Meu co-orientador **Ricardo Fujiwara**, peça essencial para a realização do sonho de estudar em uma instituição de referência. Obrigada por todo o carinho e palavras positivas, essenciais para que eu continuasse a caminhada. Eterna gratidão!

Meu colaborador **Fabrcício** por disponibilizar o seu tempo e suas madrugadas para que esse trabalho fosse realizado. Muito obrigada! Ao colaborador **Edward**.

Agradeço aos professores e exemplos da ciência **Egler Chiari** e **Lucia Galvão** que sempre estiveram dispostos a ajudar e contribuir para um melhor aprendizado. Agradeço à Deus a oportunidade de compartilhar momentos e aprendizados com quem já admirava desde sempre. Assim como o **Afonso**, meu amigo querido, com quem pude sempre contar. Sentirei saudades das nossas conversas e sobretudo do seu abraço sincero!

Aos demais professores do departamento, em especial professora à **Norma**, responsável pela minha volta à academia, e professores **Maurício, Álvaro e Stephan** pela amizade

À todos os funcionários do departamento, não sei o que seria do nosso dia-dia sem **Afonso, Rosa, César, João Carlos, Joãzinho, Dona Cida, Tati** e **Luciana**.

Meu querido **"Seu Nery"** sempre com um lindo sorriso no rosto e um cafezinho para aquecer o coração e o corpo. Agradeço o carinho diário

À **Síbele** e **Sumara** por toda ajuda, dedicação, carinho e amizade ao nosso programa e seus alunos.

Aos amigos do DP, em especial o **Rafael Pessoa, Rodolfo Cesar** e **Gisele Macedo** que se tornaram super companheiros.

Aos meus amores **Elís, Dani, Ramon, Tiago** e **Andressa** que me acompanharam por toda a jornada, cada alegria foi multiplicada e as tristezas divididas, tornando a vida tão mais leve e alegre. Vocês me ajudaram a manter (e perder) a calma e a sanidade, por isso, Amo Vocês! Sou grata à **Dani** e **Elís** principalmente nesta reta final, definitivamente não conseguiria seguir sem vocês!

À todos do laboratório Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos em especial à **Michele**, sempre disposta à ajudar e do laboratório de Helmintoses Intestinais em especial **Vanessinha, Diogo, João Paulo** e meu eterno mestre **Roney**.

À **Mayra**, uma colaboração que terminou em amizade e confidências.

*Wagníssimo*, meu companheiro de forró, de carnaval e, se Deus quiser, de vida!

*Wagner*, não sei se ficará para sempre na minha vida, mas com certeza ficará para sempre na minha memória!

*Andre Talvani* meu eterno orientador, amigo e exemplo acadêmico, com você aprendi que ciência vai muito além do laboratório e que a amizade e respeito são mais importantes que o sucesso dos resultados. E meus amigos e companheiros oriundos da pesquisa (UFOP) que levaremos por toda a vida, *Claudinha, Magna, Tassiane, Vivian e Guilherme*

Ao *Abdallah*, por toda paciência e carinho. Aprendi muito com você! Muito obrigada por tudo!

As “velhas” amigas que a vida proporcionou e o amor conservou: *Lud, Marina, Cris, Juju, Lili e Luaninha*

Minha família, em especial tia *Denise* e meus primos *Mari e Lucas* pela acolhida no final do curso, tia *Tania* e meu querido afilhado *Daniel*. Claro, meu irmão *Rafa* e minha cunhada *Lala*, minha vida em BH sem vocês não tem sentido. *Paí, mãe e irmãs* sempre presentes mesmo distantes. Amo vocês!

À *Princesa* essa gatinha carinhosa que me adotou e cuidou tão bem de mim em todos os momentos nesses últimos dois anos e meio. Foi minha companheira nas noites de estudo, nos momentos doentes e nas horas de alegria.

Agradeço profundamente às minhas irmãs de alma da inesquecível *República Quarto Crescente*, moradoras e ex-alunas pelo carinho, apoio e amizade verdadeira. Amo vocês! Em especial à *K-lada, Kenk's, Tchú, Fiel e Tíryn*, não sei o que seria da minha vida sem vcs!

Ao *Guilherme*, muito importante no ingresso e início do curso e ainda mais importante no meu desenvolvimento e reconhecimento pessoal. Tudo dá certo ate onde tem que dar. *Beto e Jake* pelo carinho. E à turma dos *Meninos de Ouro*, especialmente *Jana, João, Barb's, Victão, Nanda e Rapha* pela acolhida, amo vocês!

À *UFMG e PPG em Parasitologia*, por todas as oportunidades e ensinamentos.

À *CAPES, CNPq e INCTV*, que proporcionaram condições para que este trabalho fosse realizado.

Aos meus animais (*meus pretinhos*) que deram a vida para que possamos tentar salvar a nossa.

Foram 4 anos de doutorado, muitas coisas aconteceram no caminho, muitas vezes tive vontade de desistir ou, ate mesmo, dúvidas se conseguiria continuar. Porém, na minha vida, fui abençoada com muitos anjos que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e me lembrando que nessa vida tudo posso! Obrigada!



## RESUMO

Até agora, a vacinação tem sido um mecanismo importante para o controle e prevenção de doenças infecciosas e o avanço da vacina levou a melhorias para a sobrevivência infantil, aumentando a expectativa de vida durante o século XX. No entanto, para algumas Doenças Tropicais Negligenciadas, como a doença de Chagas, não existem vacinas ou fármacos eficientes para prevenir e/ou tratar essas doenças. Causada pelo parasito protozoário tripanosomatídeo *Trypanosoma cruzi*, a doença de Chagas está entre os principais problemas de saúde na América Latina, com alerta do aumento de casos nos EUA e na Europa devido aos movimentos migratórios da população. O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a eficácia de vacinas baseadas em carboidratos como  $\alpha$ Gal e rhamnose, presentes na superfície de formas tripomastigotas do *T. cruzi*, acoplados ao bacteriófago modificado Q $\beta$  “vírus like particle”, em animais deficientes em  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase ( $\alpha$ GalT-KO) que mimetizam o hospedeiro humano na produção de anticorpos anti- $\alpha$ Gal. Para isso, primeiramente analisamos a diferença na resposta da infecção entre animais que possuem a enzima  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase ( $\alpha$ GalT-WT) e animais que não possuem essa enzima ( $\alpha$ GalT-KO). Foi observado uma menor parasitemia e maior sobrevivência dos animais  $\alpha$ GalT-KO. Em seguida, estes animais receberam doses da vacina contendo resíduos de  $\alpha$ Gal (Q $\beta$ - $\alpha$ Gal), Rhamnose (Q $\beta$ -Rham), ambos (Q $\beta$ - $\alpha$ Gal/Rham), glucose (Q $\beta$ -Glu), natural do organismo tanto humano quanto animal, e nenhum resíduo (Q $\beta$ ), sendo estes dois últimos grupos considerados como controle. Posteriormente, os animais foram infectados com cepas de diferentes Discrete Typing Unit (DTU's). Os resultados demonstraram que os animais que receberam a vacina contendo Q $\beta$ - $\alpha$ Gal foram capazes de reagir melhor a infecção, mantendo o peso corporal e uma menor parasitemia, menos ninhos de amastigotas e inflamação mais branda no tecido cardíaco e, conseqüentemente, uma maior sobrevivência quando comparados aos animais que receberam a partícula com outros resíduos ou nenhum resíduo. Este estudo com animais que simulam a resposta humana na produção de anticorpos anti- $\alpha$ Gal, juntamente com o uso de antígenos capazes de ativar fortemente a sua resposta humoral e celular, pode ser a chave para o melhor entendimento do sistema imune durante a infecção, e assim, um importante passo para o tratamento mais eficiente da doença de Chagas.

Palavras-chave: Doença de Chagas, vacina de carboidrato, animais  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase knockout, Q $\beta$  “vírus like particle”,  $\alpha$ Gal, Rhamnose

## ABSTRACT

So far, vaccination has been an important mechanism for controlling and preventing infectious diseases and the advancement of the vaccines has improved the child survival, increasing life expectancy during the twentieth century. However, for some Neglected Tropical Diseases, such as Chagas disease, there are no vaccines or effective drugs to prevent and/or treat the disease. Caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, the Chagas disease is among the main health problems in Latin America, warning of the increase in cases in the US and Europe, due to the migratory movements of the population. The main objective of this work was to evaluate the efficacy of carbohydrate-based vaccines such as  $\alpha$ Gal and rhamnose, present on the surface of trypomastigote forms of *T. cruzi*, coupled to the modified bacteriophage Q $\beta$  virus like particle, in  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase-deficient animals ( $\alpha$ GalT-KO), which mimic the human host in the production of anti- $\alpha$ Gal antibodies. For this, we first analyzed the difference in the infection response between animals that have the  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase enzyme ( $\alpha$ GalT-WT) and in animals that do not have the enzyme ( $\alpha$ GalT-KO). We could notice a lower parasitemia and greater survival of the  $\alpha$ GalT-KO animals. Then, these animals received doses of the vaccine containing residues of  $\alpha$ Gal (Q $\beta$ - $\alpha$ Gal), Rhamnose (Q $\beta$ -Rham), both (Q $\beta$ - $\alpha$ Gal/Rham), glucose (Q $\beta$ -Glu) which is natural to both the human and animal organism and no residue (Q $\beta$ ), the latter two as control groups. Subsequently, the animals were infected with strains of different Discrete Typing Unit (DTU's). The results demonstrate that animals who received the Q $\beta$ - $\alpha$ Gal vaccine presented a better reaction to infection, maintaining a lower parasitemia and the body weight, fewer amastigotes's nests, a mild inflammation in the cardiac tissue and, consequently, a greater survival when compared to the animals that received the particle with other residues or no residue at all. This study with animals that simulate the human response in the production of anti- $\alpha$ Gal antibodies, together with the use of antigens capable of strongly activating their humoral and cellular responses, may be the key to a better understanding of the immune system during infection, and thus, an important step towards a most efficient treatment for Chagas disease

Keywords: Chagas disease, carbohydrate vaccine,  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase knockout animals, Q $\beta$  "*virus-like particle*",  $\alpha$ Gal, Rhamnosis

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Distribuição da Doença de Chagas nas Américas (Fonte: Coura & Dias, 2009) .....3
- Figura 2** - Representação esquemática do ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*. 1. O inseto vetor infectado, ao se alimentar com o sangue do hospedeiro vertebrado, libera próximo ao local da picada, tripomastigotas em suas fezes. Os tripomastigotas entram no hospedeiro através da ferida ou de mucosas intactas. 2. Dentro do hospedeiro, os tripomastigotas invadem as células próximas ao local de infecção, onde se diferenciam em amastigotas intracelulares. 3. Os amastigotas se multiplicam por divisão binária. 4. Se diferenciam em tripomastigotas, e são liberados na circulação como tripomastigotas sanguíneos. Estes parasitos podem infectar células de tecidos variados e se diferenciar em amastigotas repetindo o passo 3, ou 5; podem ser ingeridos pelo inseto vetor. 6. Os tripomastigotas ingeridos se transformam em epimastigotas no intestino médio do inseto. 7. Os parasitos se multiplicam 8. e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos no intestino posterior, estando pronto para reiniciar o ciclo (Fonte: adaptado de Center for Disease Control and Prevention). .....3
- Figura 3** - Estrutura química do resíduo  $\alpha$ Gal (Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-R). (Fonte: ANRAKU *et al.*, 2017). ..... 9
- Figura 4** - Evolução do gene  $\alpha$ 1,3GT, do epítipo  $\alpha$ -Gal e do anticorpo natural anti-  $\alpha$ Gal em mamíferos, conforme ilustrado em uma árvore evolutiva esquemática. As linhas pontilhadas marcam o possível período evolutivo em que primatas ancestrais do Velho Mundo começaram a ser selecionados para a inativação do gene  $\alpha$ 1,3GT. (Adaptado de: GALILI, 2015). ..... 10
- Figura 5** - Ilustração de epítipos  $\alpha$ -Gal (marcados por retângulos de linhas tracejadas) sobre glicoproteínas (A) e sobre glicolipídios (B). Como ilustrado, os epítipos  $\alpha$ -Gal, em ambas, são capazes de se ligar ao anticorpo natural anti-  $\alpha$ Gal. (GALILI, 2015). ..... 11
- Figura 6** - Estrutura química do resíduo Rhamnose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>). (Fonte: CHEN *et al.*, 2010). 12
- Figura 7** - Esquema da resposta à vacina contendo antígeno de carboidrato mediada por anticorpos com imunogenicidade aumentada (Fonte: CHEN *et al.*, 2010). ..... 13
- Figura 8** - Avaliação do perfil de resistência à infecção com cepas Y e Colombiana entre os animais selvagens (WT) e geneticamente deficientes para  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferase .....26
- Figura 9** – Análise da imunogenicidade da partícula Q $\beta$ -VLP com 180 resíduos do carboidrato  $\alpha$ Gal acoplados [Q $\beta$ ( $\alpha$ Gal)<sub>180</sub>] .....27

<b>Figura 10</b> - Confirmação da especificidade do anticorpo produzido após imunização com 540 resíduos de $\alpha$ Gal acoplados à Q $\beta$ -VLP.....	27
<b>Figura 11</b> - Determinação da dose de imunização da vacina contendo partículas Q $\beta$ -VLP com 540 resíduos do carboidrato $\alpha$ Gal acoplados [Q $\beta$ ( $\alpha$ Gal) <sub>540</sub> ].....	28
<b>Figura 12</b> - Acompanhamento da infecção de animais $\alpha$ 1,3GT-KO com a cepa Colombiana e clone Cl-Brener de <i>T. cruzi</i> .....	29
<b>Figura 13</b> - Síntese de virus-like particle (VLP) Q $\beta$ ( $\alpha$ -Gal) <sub>540</sub> . Resumo das etapas realizadas para ligar covalentemente o trissacarídeo $\alpha$ -Gal [Gal $\alpha$ (1,3)Gal $\beta$ (1,4)GlcNAc $\alpha$ ] à VLP por ligação azida/alcino. A imagem na esquerda é uma representação da estrutura cristalina por raios-X da partícula Q $\beta$ . (BRITO <i>et al.</i> , 2016).....	31
<b>Figura 14</b> - Parasitemia e sobrevivência de camundongos $\alpha$ 1,3GT-WT e $\alpha$ 1,3GT-KO infectados com a cepa Y nas concentrações de 10 <sup>4</sup> , 10 <sup>5</sup> e 10 <sup>6</sup> (14A, 14B e 14C respectivamente). n = 3. Considerado significativo (*) o p<0,05. DPI: Dias pós infecção.....	39
<b>Figura 15</b> - Parasitemia e sobrevivência de camundongos $\alpha$ 1,3GT-WT e $\alpha$ 1,3GT-KO infectados com a cepa Colombiana nas concentrações de 10 <sup>4</sup> , 10 <sup>5</sup> e 10 <sup>6</sup> (15A, 15B e 15C respectivamente). n = 3. Considerado significativo (*) o p <0,05. DPI: Dias pós infecção .39	39
<b>Figura 16</b> – Acompanhamento da (A) parasitemia, (B) variação do peso e (C) sobrevivência dos animais $\alpha$ 1,3GT-KO imunizados com Q $\beta$ contendo 180 partículas de $\alpha$ Gal (Q $\beta$ - $\alpha$ Gal) ou não (Q $\beta$ ). n = 5.....	40
<b>Figura 17</b> - Produção de anticorpos anti- $\alpha$ Gal séricos em animais $\alpha$ 1,3GT-KO imunizados (Q $\beta$ - $\alpha$ Gal) ou não (Q $\beta$ ). n = 5. DPI: Dias pós infecção; Considerado significativo (*) p < 0,01.41	41
<b>Figura 18</b> – Reatividade do soro de animais $\alpha$ 1,3GT-KO imunizados com Q $\beta$ - $\alpha$ Gal ou controles (Q $\beta$ -Glu ou PBS) antes e após o tratamento com a enzima $\alpha$ -Galactosidase. n = 3. Naive: tratado i.p. com PBS .....	41
<b>Figura 19</b> – Acompanhamento da (A) curvas de parasitemia, (B) variação do peso corporal, (C) sobrevivência e (D) detecção de IgG anti- $\alpha$ Gal por ELISA nos soros dos camundongos C57BL/6 $\alpha$ 1,3GT-KO imunizados ou não, e infectados com 10 <sup>4</sup> formas tripomastigotas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> . n= 3. Os dados acima foram analisados como média +/- SEM e analisados por One Way ANOVA (teste Bonferroni) e teste t student, sendo considerado significativo (* ou letras diferentes) o p<0,05.....	42

**Figura 20** - Fotomicrografia de corte histológico do coração de camundongos imunizados com diferentes doses e infectados com a cepa Y de *T. cruzi* e eutanasiados após 33 dias de infecção. Todos os animais apresentaram inflamação moderada. A) Grupo controle (PBS) presença de muitos ninhos de amastigotas. B) 2,5 µg de Qb-αGal: presença de poucos ninhos de amastigotas. C) 5 µg de Qb-αGal: ausência de ninhos de amastigotas. D) 10 µg de Qb-αGal: ausência de ninhos de amastigotas. n = 3. Coloração Hematoxilina e eosina. Ninhos de amastigotas ( ► ) Foto em destaque: barra = 50 µm; Foto em detalhe: barra = 10 µm .....43

**Figura 21** – Avaliação da carga parasitária cardíaca após imunizações com 2,5µg, 5µg e 10µg e PBS como controle. A carga parasitária foi determinada pela técnica de PCR quantitativa. n=3. Diferença considerada significativa entre os grupos controle (PBS) e 5µg (\*) quando  $p < 0,05$ . .....44

**Figura 22** - Acompanhamento das (A e B) curvas de parasitemia, (C e D) variação do peso corporal e (E e F) sobrevivência em camundongos C57BL/6 α1,3GT-KO infectados com  $10^3$  formas tripomastigotas da cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*. Os resultados acima são referentes à experimentos de (A, C e E) 21 dias e (B, D e F) 63 dias de infecção. Os dados acima foram apresentados como média +/- SEM e analisados por One Way ANOVA (teste Bonferroni) e teste t student, sendo significativo (\*) o  $p < 0,05$ . n= 3. DPI: Dias pós infecção. ....45

**Figura 23** – Acompanhamento das (A e B) curvas de parasitemia, (C e D) variação do peso corporal e (E e F) sobrevivência em camundongos C57BL/6 α1,3GT-KO infectados com  $10^2$  formas tripomastigotas do clone CL-Brener de *Trypanosoma cruzi*. Os resultados acima são referentes à experimentos de (A, C e E) 14 dias e (B, D e F) 63 dias de infecção. Os dados acima foram apresentados como média +/- SEM e analisados por One Way ANOVA (teste Bonferroni) e teste t student, sendo significativo (\*) o  $p < 0,05$ . n= 5. DPI: Dias pós infecção. ....46

**Figura 24** - Detecção de IgG anti-antígeno por ELISA nos soros dos camundongos imunizados e infectados com o clone CL-Brener: Produção de anticorpos pelos grupos imunizados com Qβ-αGal (A), Qβ-Rham (B) e Qβ-αGal/Rham (C). Letras diferentes mostram diferenças entre os grupos quando  $p < 0,05$ . † = animais não sobreviveram até 63 DPI. ....47

**Figura 25** - Fotomicrografia de corte histológico do coração de camundongos infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* e eutanasiados após 21 dias de infecção. A) Grupo Qβ-Glu: infiltrado inflamatório moderado no miocárdio. B) Qβ-αGal: discreto infiltrado inflamatório no

miocárdio. C) Q $\beta$ -Rham: Presença de infiltrado inflamatório moderado no miocárdio. D) Q $\beta$ - $\alpha$ Gal/Rham: infiltrado inflamatório moderado no miocárdio. n=3. Coloração Hematoxilina e eosina, barra = 50  $\mu$ m. ....48

**Figura 26** - Fotomicrografia de corte histológico do coração de camundongos infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* e eutanasiados após 63 dias de infecção. A) Grupo Q $\beta$ -Glu: presença moderada de infiltrado inflamatório. B) Q $\beta$ - $\alpha$ Gal: moderado infiltrado inflamatório no miocárdio. C) Q $\beta$ -Rham: presença de infiltrado inflamatório discreto no miocárdio. D) Q $\beta$ - $\alpha$ Gal/Rham: infiltrado inflamatório moderado no miocárdio. n= 3. Coloração Hematoxilina e eosina, barra = 50  $\mu$ m .....49

**Figura 27** - Fotomicrografia de corte histológico do coração de camundongos infectados com o clone CL-brener de *T. cruzi* e eutanasiados após 14 dias de infecção. A) Grupo Q $\beta$ -Glu: presença discreta de infiltrado inflamatório. B) Q $\beta$ - $\alpha$ Gal: discreto infiltrado inflamatório no miocárdio. C) Q $\beta$ -Rham: presença moderada de infiltrado inflamatório no miocárdio. D) Q $\beta$ - $\alpha$ Gal/Rham: infiltrado inflamatório moderado no miocárdio. n = 5. Coloração Hematoxilina e eosina, barra = 50  $\mu$ m. ....50

**Figura 28** - Fotomicrografia de corte histológico do coração de camundongos infectados identificando a ausência de fibrose em todos os grupos da cepa Colombiana e clone CL-Brener de *T. cruzi* nos dois momentos analisados. Ausencia de fibrose ilustrada por A) Colombiana imunizado com Q $\beta$ -Glu eutanasiado com 21 DPI. B) Colombiana imunizado com Q $\beta$ -  $\alpha$ Gal eutanasiado com 63 DPI. C) Cl-Brener imunizado com Q $\beta$ -Rham eutanasiado com 14 DPI. D) imunizado com Q $\beta$ - $\alpha$ Gal/Rham eutanasiado com 63 DPI. Coloração Tricrômico de Gomori, barra = 50  $\mu$ m. ....51

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Análise histológica dos animais  $\alpha$ 1,3GT-KO imunizados com diferentes doses de Q $\beta$ - $\alpha$ Gal .....43

**Tabela 2** – Análise semi-quantitativa inflamatória histopatológica de cortes do miocárdio de camundongos dos grupos Q $\beta$ , Q $\beta$ -Glu, Q $\beta$ - $\alpha$ Gal, Q $\beta$ -Rham e Q $\beta$ - $\alpha$ Gal/Rham infectados com a cepa Colombiana ou clone CL-Brener nos tempos pesquisados. †: animais não sobreviveram à infecção; - grupos não realizados.....51

## LISTA DE ABREVIATURAS

<i><math>\alpha</math>-Gal</i>	<i>Epítopo Gala1-3Gal<math>\beta</math>1-4GlcNAc-R</i>
<i><math>\alpha</math>1,3GT</i>	<i>Enzima <math>\alpha</math>-1,3-galactosiltransferase</i>
<i><math>\alpha</math>1,3GT-KO</i>	<i>Camundongo geneticamente modificado para a enzima <math>\alpha</math>1,3GT</i>
<i><math>\alpha</math>1,3GT-WT</i>	<i>Camundongo <math>\alpha</math>1,3GT selvagem</i>
<i>anti-Rham</i>	<i>Anticorpos anti-mono-Lrhamnose</i>
<i>anti-<math>\alpha</math>Gal</i>	<i>Anticorpos anti <math>\alpha</math>-Gal</i>
<i>APCs</i>	<i>Células apresentadoras de antígenos</i>
<i>BZ</i>	<i>Benzonidazol</i>
<i>CD</i>	<i>Células dendríticas</i>
<i>DC</i>	<i>Doença de Chagas</i>
<i>DNA</i>	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
<i>DPI</i>	<i>Dias pós-infecção</i>
<i>DTU</i>	<i>Discrete Typing Unit (unidades discretas de tipagem)</i>
<i>ELISA</i>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ensaio imunoenzimático)</i>
<i>EUA</i>	<i>Estados Unidos da América</i>
<i>ft</i>	<i>Formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i></i>
<i>GalNAc</i>	<i>N-Acetilgalactosamina</i>
<i>GIPLs</i>	<i>Glicoinositolfosfolipideos</i>
<i>Glu</i>	<i>Glicose</i>
<i>HAR</i>	<i>Rejeição hiperaguda</i>
<i>LPGs</i>	<i>Lipofosfoglicanos</i>
<i>MHC</i>	<i>Complexo principal de histocompatibilidade</i>
<i>NFX</i>	<i>Nifurtimox</i>
<i>OPAS</i>	<i>Organização Pan-Americana de Saúde</i>
<i>OPD</i>	<i>Ortho-phenylenediamine (ortofenilenodiamina)</i>
<i>PBS</i>	<i>Phosphate Buffered Saline (tampão fosfato salino)</i>



<i>PBS/BSA</i>	<i>PBS contendo albumina sérica bovina</i>
<i>PCR</i>	<i>Reação em cadeia da polimerase</i>
<i>pH</i>	<i>Potencial hidrogeniônico</i>
<i>Q<math>\beta</math></i>	<i>Bacteriófago Q<math>\beta</math></i>
<i>Q<math>\beta</math>(<math>\alpha</math>-Gal)<i>n</i></i>	<i>Q<math>\beta</math> virus-like particle com “n” unidades do epítipo <math>\alpha</math>-Gal na superfície</i>
<i>Q<math>\beta</math>(Glc) n</i>	<i>Q<math>\beta</math> virus-like particle com “n” moléculas de glicose na superfície</i>
<i>Q<math>\beta</math>-VLP</i>	<i>Bacteriófago Q<math>\beta</math> virus like particle</i>
<i>Rham</i>	<i>Rhamnose</i>
<i>RNA</i>	<i>Ácido ribonucleico</i>
<i>spp.</i>	<i>Espécies do gênero</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T CD4+</i>	<i>Linfócito T auxiliar</i>
<i>T CD8+</i>	<i>Linfócito T citotóxico</i>
<i>UFMG</i>	<i>Universidade Federal de Minas Gerais</i>
<i>UTEP</i>	<i>University of Texas at El Paso</i>
<i>VLP</i>	<i>Virus-like Particle</i>
<i>WHO</i>	<i>World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>2</b>
1.1 Aspectos Gerais da doença de Chagas e <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	2
1.2 Tratamento e vacinas na doença de Chagas.....	6
1.3 Epítomos $\alpha$ Gal.....	9
1.4 Epítomos Rhamnose .....	11
1.5 Anticorpos anti- $\alpha$ Gal.....	12
1.6 Anticorpos anti-Rhamnose.....	14
1.7 Q $\beta$ - Virus Like Particle (Q $\beta$ -VLP) .....	15
1.8 Animais geneticamente deficiente para a enzima $\alpha$ -1,3-galactosiltransferase.....	17
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>21</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
3.1 Geral.....	24
3.2 Específicos .....	24
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
4.1 Delineamento experimental .....	26
4.1.1 Avaliação do modelo experimental.....	26
4.1.2 Avaliação da imunogenicidade da vacina Q $\beta$ ( $\alpha$ -Gal) <sub>180</sub> .....	26
4.1.3 Confirmação da especificidade do anticorpo IgG anti- $\alpha$ Gal .....	27
4.1.4 Determinação da dose de Q $\beta$ - $\alpha$ Gal a ser administrada .....	28
4.1.5 Infecção com cepa Colombiana e clone Cl-Brener em diferentes tempos de infecção ..	28
4.2 Considerações éticas na experimentação animal .....	29

4.3 Animais .....	30
4.4 Cepas do <i>Trypanosoma cruzi</i> e manutenção dos parasitos .....	30
4.5 Preparo das Q $\beta$ virus-like particles (Q $\beta$ -VLP).....	30
4.6 Imunização dos animais .....	32
4.7 Inoculação dos animais .....	32
4.8 Parasitemia e taxa de sobrevivência.....	33
4.9 Acompanhamento do peso .....	33
4.10 Necrópsia e análise semi-quantitativa das lesões cardíacas nos camundongos C57BL/6 ( $\alpha$ 1,3GT-KO) infectados .....	33
4.11 Extração de DNA do coração, de camundongos C57BL/6 ( $\alpha$ 1,3GT-KO) infectados com a cepa Colombiana e clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> .....	34
4.12 Avaliação da carga parasitária tecidual cardíaca de camundongos C57BL/6 ( $\alpha$ 1,3GT-KO) infectados com a cepa Colombiana ou clone CL Brener de <i>T. cruzi</i>	35
4.13 Remoção do epítipo $\alpha$ Gal.....	36
4.14 Resposta imune humoral – Anticorpos Líticos Anti- $\alpha$ Gal.....	36
4.15 Análise estatística.....	36
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
5.1 Avaliação do perfil de resistência à infecção com cepas Y e Colombiana entre os animais selvagens e geneticamente deficientes para $\alpha$ -1,3-galactosiltransferase ....	38
5.2 Imunogenicidade da partícula Q $\beta$ VLP contendo 180 resíduos do carboidrato $\alpha$ Gal em animais geneticamente deficientes em $\alpha$ Gal .....	39
5.3 Confirmação da especificidade do anticorpo IgG anti- $\alpha$ Gal.....	41
5.4 Definição da dose vacinal a ser administrada .....	42

5.5 Acompanhamento da infecção de animais $\alpha$ 1,3GT-KO com a cepa Colombiana e clone CI-Brener de <i>T. cruzi</i> .....	44
5.6 Verificação da produção de anticorpos em camundongos $\alpha$ 1,3GT-KO.....	46
5.7 Análise semi-quantitativa das lesões cardíacas nos camundongos C57BL/6 ( $\alpha$ 1,3GT-KO) infectados com a cepa Colombiana e o clone CI-Brener .....	47
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>62</b>
<b>9 ANEXOS.....</b>	<b>78</b>
9.1 Considerações éticas na experimentação animal .....	79
9.2 Artigo publicado como Co-Autora: .....	80
9.3 Artigo publicado como Co-Autora: .....	81

# ***Introdução***

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos Gerais da doença de Chagas e *Trypanosoma cruzi*

A tripanossomíase americana ou doença de Chagas (DC) é uma importante antroponose que acompanha a espécie humana e outras espécies de mamíferos desde a antiguidade e é ainda hoje uma das mais sérias doenças parasitárias do Brasil. Segundo a Organização Mundial de Saúde - WHO (WHO, 2015a), atualmente a DC encontra-se entre as 17 infecções parasitárias que fazem parte das doenças tropicais negligenciadas. É uma infecção de caráter crônico, de difícil manejo e tratamento, além de apresentar uma importante carga de morbidade, incapacidade e mortalidade nos países da América Latina (OPAS, 2006), representando um alto impacto econômico devido ao alto custo das medidas de saúde pública para o controle do vetor, diagnóstico e tratamento dos pacientes e do impacto na produtividade e deficiência prematura dos indivíduos afetados (TARLETON *et al.*, 2007; BERN & MONTGOMERY, 2009; HANFORD, 2007; LEE *et al.*, 2010; REMME *et al.*, 2006) além do impacto social e cultural (WHO, 2002) estando diretamente relacionada à pobreza. Fatores como migrações humanas não controladas, degradação ambiental, alterações climáticas, maior concentração da população em áreas urbanas e precariedade de condições socioeconômicas (habitação, educação, saneamento, renda, entre outras) são determinantes para a transmissão de *T. cruzi* ao homem (DIAS, *et al.* 2016).

Segundo a WHO (WHO, 2015), há aproximadamente 6 a 7 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo, e a grande maioria presente na América Latina, principalmente na Argentina, Brasil, México e Bolívia (**Figura 1**), com aproximadamente 30.000 novos casos anuais devido à transmissão vetorial, e 70 milhões de indivíduos em risco de infecção em áreas endêmicas. A DC não está restrita à América Latina, repressões políticas e/ou estagnação econômica estimulam migrações de países endêmicos da DC para países mais desenvolvidos, fazendo com que a DC se tornasse um problema de saúde global (SCHMUNIS & YADON, 2010; VILLANUEVA-LIZAMA., *et al.* 2018). Apesar do Brasil ter recebido em 2006 a certificação de país livre da transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans*, a epidemiologia da DC apresenta obstáculos para o controle efetivo da doença, com casos recentes de transmissão vetorial, comprovando a necessidade de se manter a vigilância epidemiológica no país (BORGES *et al.*, 2006).

## Endêmica em 21 países da América



Figura 1 - Distribuição da Doença de Chagas no mundo (Fonte: Drugs for Neglected Disease *initiative*, site)

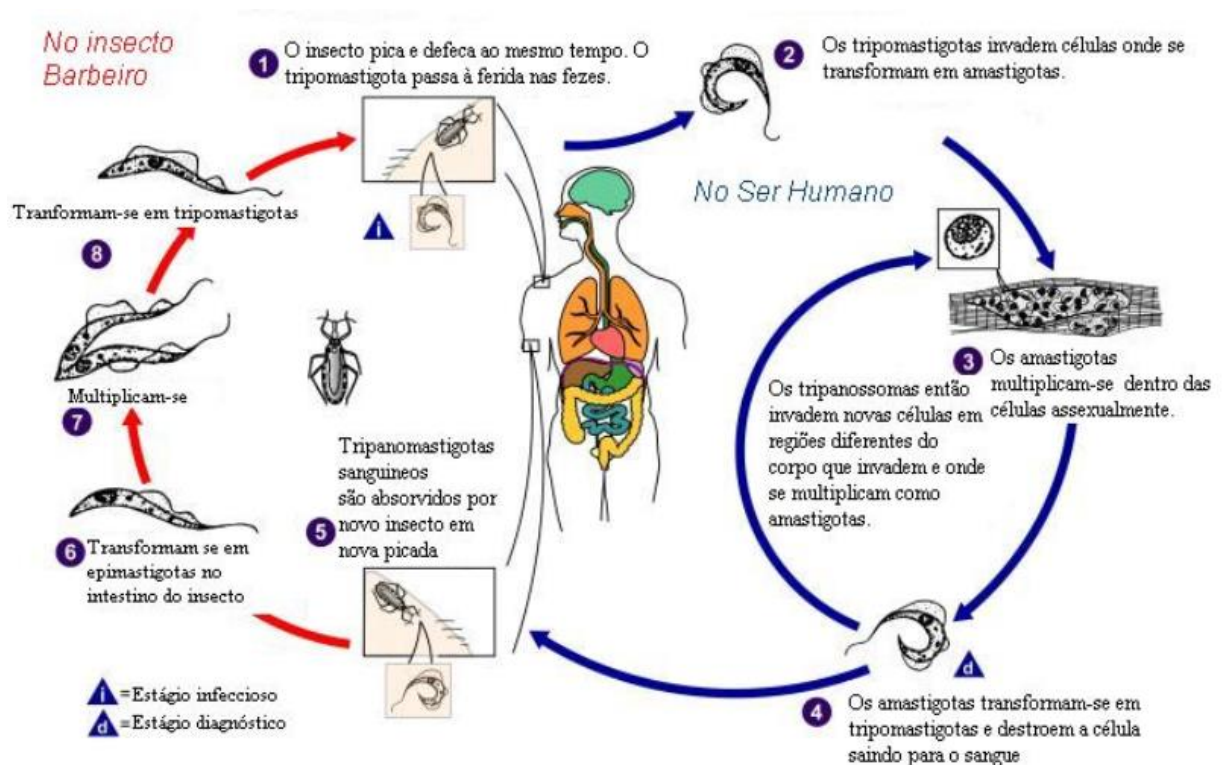


Figura 2 - Representação esquemática do ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*. 1. O inseto vetor infectado, ao se alimentar com o sangue do hospedeiro vertebrado, libera próximo ao local da picada, tripomastigotas em suas fezes. Os tripomastigotas entram no hospedeiro através da ferida ou de mucosas intactas. 2. Dentro do hospedeiro, os tripomastigotas invadem as células próximas ao local de infecção, onde se diferenciam em amastigotas intracelulares. 3. Os amastigotas se multiplicam por divisão binária. 4. Se diferenciam em tripomastigotas, e são liberados na circulação como tripomastigotas sanguíneos. Estes parasitos podem infectar células de tecidos variados e se diferenciam em amastigotas repetindo o passo 3, ou 5; podem ser ingeridos pelo inseto vetor. 6. Os tripomastigotas ingeridos se transformam em epimastigotas no intestino médio do inseto. 7. Os parasitos se multiplicam 8. e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas no intestino posterior, estando pronto para reiniciar o ciclo (Fonte: adaptado de Center for Disease Control and Prevention).

O *T. cruzi* pode ser transmitido ao hospedeiro vertebrado por vários mecanismos, sendo que a transmissão vetorial ainda representa a de maior importância epidemiológica. Porém, a infecção pode ser adquirida também por transfusão sanguínea ou transplante de órgãos, via oral, transmissão congênita e acidentes de laboratório (BRENER, 1984; DIAS, 1992; WHO, 2002; DIAS *et al.*, 2008; DIAS, 2009; NOBREGA *et al.*, 2009; QUIJANO-HERNANDEZ, 2011)

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. É um organismo digenético necessitando de um hospedeiro vertebrado (mamífero) e um invertebrado (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) para completar seu ciclo (**Figura 2**). Na transmissão vetorial, ocorre a deposição de formas tripomastigotas metacíclicas pelo triatomíneo através da urina e fezes no momento do repasto sanguíneo. Estas formas penetram na pele lesada ou na mucosa, infectando qualquer célula nucleada (BRENER, 1987). Os tripomastigotas desenvolveram complexos mecanismos de invasão celular que envolvem diferentes tipos celulares e interação com moléculas na superfície dessas células, eventos enzimáticos, sinalização celular mediada por cálcio ( $Ca^{2+}$ ) e alterações na membrana, no citoesqueleto e nas organelas, permitem a formação de um vacúolo parasitóforo contendo o parasito no interior da célula hospedeira (EPTING *et al.*, 2010). O parasito entra por depressões da membrana formando uma vesícula parasitófora num processo dependente de lisossomos (YOSHIDA, 2006; YOSHIDA, 2008). Após a fusão dos lisossomos ao vacuolo parasitóforo, (fagolisossomo), por influência do pH ácido, os tripomastigotas no citoplasma se diferenciam em amastigotas que se multiplicam por sucessivas divisões binárias. Quando a célula tem seu citoplasma repleto de amastigotas estas se transformam em tripomastigotas, que após o rompimento da célula hospedeira podem infectar outras células adjacentes ou cair na corrente sanguínea, infectando tecidos mais distantes e iniciando um novo ciclo (BURLEIGH & WOOLSLEY, 2002; YOSHIDA, 2006). Manifestações clínicas podem resultar deste ciclo infeccioso. As formas tripomastigotas presentes na corrente sanguínea mantém a infecção crônica na maioria dos indivíduos, e podem ainda, ser ingeridas pelo triatomíneo durante o repasto sanguíneo. Após a ingestão pelo inseto vetor, fatores presentes no intestino médio anterior reduzem a população de tripomastigotas ingeridas. As tripomastigotas restantes se transformam em formas intermediárias, e em seguida em epimastigotas no intestino médio posterior (DIAS, 1933; Dias, 1934; FERREIRA *et al.*, 2016). As epimastigotas ao atingirem a extremidade posterior do intestino, se ligam à parede do reto e diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicas que são infectantes e não replicativas (DIAS, 1933; Dias, 1934; MINNING *et al.* 2009). No intestino posterior e no reto, as tripomastigotas metacíclicas livres



se misturam com o conteúdo da urina e fezes do vetor, sendo liberadas junto à estas, durante o ciclo de alimentação seguinte (DIAS, 1933; Dias, 1934; JIMENEZ, 2014).

O curso da DC consiste inicialmente de uma fase aguda, que pode durar de 30-90 dias e é caracterizada pela presença de níveis geralmente elevados da parasitemia sanguínea, por sinais e sintomas quase sempre inespecíficos (CHAGAS, 1909; DIAS *et al.*, 1956, PENNA *et al.*, 2005) como: febre, mal-estar, mialgia, calafrios, náusea, vômitos, diarreia e enfartamento ganglionar e hepatoesplenomegalia o que dificulta o diagnóstico clínico precoce da infecção (GOLGHER & GAZZINELLI, 2004; ROCHA *et al.*, 2007). Em infecções vetoriais, os sinais de porta de entrada do *T. cruzi* são o chagoma de inoculação (quando a infecção ocorre pela pele) ou o Sinal de Romaña (quando ocorre através da mucosa ocular) (ROMAÑA, 1963; RASSI JR, RASSI & MARIN-NETO, 2010). Nesta fase da doença ocorre aproximadamente 5% de mortalidade, que geralmente é resultante da infecção em crianças menores de dois anos, em decorrência de miocardite e meningoencefalite (BARRETT *et al.*, 2003).

Na maioria dos casos os sintomas desaparecem espontaneamente, sendo observada a redução da miocardite (BRENER, 1987). O parasitismo intenso, característico da fase aguda é controlado pela resposta imune do hospedeiro, estabelecendo uma infecção crônica com baixa parasitemia. Nessa fase é possível detectar anticorpos específicos por diferentes testes sorológicos e, em grande parte dos pacientes, os parasitos podem ser isolados por hemocultura ou xenodiagnóstico (WHO, 2013). Caso o indivíduo não receba tratamento adequado, este pode entrar em uma fase latente ou indeterminada, na qual a maioria dos parasitos são removidos da corrente sanguínea e dos tecidos e as pessoas infectadas evoluem para um estado de aparente equilíbrio parasito-hospedeiro, sem manifestações clínicas e alterações patológicas comuns à cronicidade da doença. No entanto, em alguns casos, estes pacientes podem vir a desenvolver problemas cardíacos e/ou digestivos. O paciente na fase crônica pode permanecer assintomático por muitos anos e passar a apresentar, ou não, as alterações cardíacas e/ou digestivas (BERN, 2011). Cerca de 30% das pessoas cronicamente infectadas são susceptíveis ao desenvolvimento de alterações cardíacas e até 10% podem apresentar problemas digestivos, neurológicos ou mais de um desses sintomas (DIAS *et al.*, 2016). Mesmo que uma parte das pessoas desenvolva as patologias da fase crônica, poucas pessoas infectadas morrem em decorrência da infecção (RODRIGUES *et al.*, 2009). As pessoas cronicamente infectadas e assintomáticas apresentam um equilíbrio entre o número de parasitos no organismo e a resposta imunológica do hospedeiro, caracterizando o que seria considerado a situação ideal para a sobrevivência do hospedeiro e do parasito (DUTRA *et al.*, 2009).

## 1.2 Tratamento e vacinas na doença de Chagas

A DC pode causar a morte devido à elevada carga parasitária na fase aguda ou à danos irreversíveis em órgãos como o coração, esôfago e cólon durante a fase crônica (FERRAZ *et al.*, 2018). O caráter de negligência da DC é evidenciado pela limitação de opções terapêuticas, com a existência de apenas dois fármacos antiparasitários disponíveis: benzonidazol - BZ (agente derivado nitroimidazólico - Rochagan, Roche) e nifurtimox - NFX (composto nitrofurânico - Lampit, Bayer) (DIAS *et al.*, 2016). Ambos tratamentos são altamente eficazes, desde que a terapia seja administrada no início da infecção e durante a fase aguda da doença, sendo o primeiro apresentando melhor segurança e eficácia (RASSI *et al.* 2010).

As cepas CL e Colombiana do *T. cruzi* são naturalmente susceptíveis e resistentes ao tratamento com BZ (FILARDI & BRENER, 1987.; SOARES. *et al.* 2012). Diferenças na suscetibilidade a BZ e NFX entre cepas de *T. cruzi* e no background genético do hospedeiro podem explicar variações no sucesso terapêutico (MURTA & ROMANHA, 1998, TOLEDO *et al.*, 2004, SOARES *et al.*, 2012). No entanto, pouquíssimos pacientes são diagnosticados neste estágio, visto que os sintomas são inespecíficos, ou por não ter acesso a um bom diagnóstico, e consequentemente, tratamento (BEAUMIER *et al.*, 2016). Atualmente na América Latina, apenas o BZ está disponível para o tratamento da DC (FERRAZ *et al.*, 2018).

O tratamento com estes fármacos é recomendado em ambas as fases da DC, no entanto, apresentam baixo poder de cura na fase crônica, já que a eficácia deste medicamento diminui com o tempo de infecção, além de apresentar severos efeitos colaterais que podem resultar na interrupção do tratamento e ser contra indicado na gravidez e para pacientes com insuficiência renal ou hepática, fazendo com que até 20% dos pacientes não possam concluir o tratamento e/ou o abandonem por seus efeitos (URBINA, 2010; ALMEIDA & NAKAYASU, 2010; BEAUMIER *et al.*, 2016; SALES JUNIOR *et al.*, 2017). Considerando estes fatores, é necessária a tentativa de desenvolver intervenções terapêuticas mais eficazes contra o *T. cruzi*.

Por apresentar um ciclo de vida complexo, envolvendo fatores inerentes ao parasito e aos hospedeiros vertebrados e invertebrados, que influenciam na evolução da doença, a DC representa atualmente um dos maiores desafios terapêuticos em medicina tropical. Esta complexidade também dificulta a formulação de uma vacina contra o parasito. A progressiva perda de visibilidade da DC, após ter a transmissão por *Triatoma infestans* considerada controlada em algumas áreas endêmicas veio a acentuar essa dificuldade (BERMUDEZ *et al.*, 2016)

Mesmo assim, estudos realizados acerca da viabilidade financeira da fabricação de uma vacina para DC na América Latina, mostraram ser altamente benéfica, proporcionando além da economia de custos, os benefícios para a saúde (MARTIN & TARLETON, 2004; LEE *et al.*, 2010). Além do impacto na saúde pública, a DC representa um fardo econômico global estimado em mais de US\$ 7 bilhões anualmente (incluindo US\$ 630 milhões em custos de cuidados de saúde) e mais de 800,000 anos de vida ajustados por incapacidade (LEE *et al.*, 2013). No entanto, não há nenhuma vacina disponível para a prevenção e/ou tratamento da DC humana crônica, apesar de numerosos estudos usando doses subletais ou cepas com virulência atenuada do parasito, formas culturais inativadas, frações celulares com antígenos purificados e vacinas de DNA que resultaram em graus variáveis de proteção, tendo em alguns casos a mortalidade pós desafio nula, mas sem evitar a parasitemia (RODRIGUES, 2017, SLATHIA & SHARMA, 2018). As recentes abordagens de vacinas de subunidades como proteínas recombinantes, vacinas de DNA e vacinas baseadas em epítomos, apresentam vantagens sobre a abordagem tradicional, como as vacinas vivas atenuadas. Estas vacinas, se baseadas em epítomos adequados, têm o potencial de proporcionar uma imunidade duradoura (SLATHIA & SHARMA, 2018).

As dificuldades para o desenvolvimento desta vacina são aumentadas pela informação restrita sobre as proteínas expressas na superfície celular do parasito em diferentes estágios, cepas e linhagens filogenéticas (ALMEIDA & NAKAYASU, 2010). Além disto, o parasito apresenta uma forte variação na expressão de proteínas entre fases, cepas e linhagens filogenéticas, que podem resultar em extensa variação antigênica e restrita imunodominância de epítomos de células T, facilitando a evasão do parasito ao sistema imune do hospedeiro (ACOSTA-SERRANNO *et al.*, 2007; JUNQUEIRA *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2009, SOUZA, 2009). O parasito apresenta também a superfície celular muito espessa e carregada negativamente (SOUTO-PADRON, 2002, LEE *et al.*, 2010) o que constitui por si só uma barreira contra os mecanismos de defesa do hospedeiro, como o sistema complemento e anticorpos.

As proteínas de superfície dos patógenos têm imensa importância para o desenho da vacina, pois são elas que irão acessar o sistema imunológico do hospedeiro, mesmo em casos de parasitos intracelulares. Com o avanço dos estudos em bioinformática, hoje reconhece-se como as principais famílias de proteínas de superfície as mucinas, proteínas ricas em amina, proteínas de superfície associadas à mucina, transialidase, GP63, cruzipaina e amastinas (SLATHIA & SHARMA, 2018).

Uma vacina para ter 100% de eficiência tem que possuir epítomos capazes de serem reconhecidos por toda população. Ou seja, a vacina deve induzir resposta protetora em toda população humana e essa resposta deve proteger contra as diversas “discrete typing units (DTUs) existentes do *T. cruzi* (RODRIGUES *et al.*, 2009, DOMINGUEZ *et al.*, 2011). Tradicionalmente, vacinas são produzidas com base na resposta imune de células B, especialmente aquelas contra bactérias e vírus. No entanto, o desenvolvimento de uma vacina baseada em células T contra formas evolutivas intracelulares como *T. cruzi* é sugerido por ser mais eficiente, uma vez que pode eliminar células infectadas (TARLETON, 2005; PEREIRA-CHIOCCOLA *et al.*, 2003; ROBINSON & AMARA, 2005). O sucesso das vacinas baseadas em células T depende de dois tipos celulares: células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. Células T CD4<sup>+</sup> fornecem citocinas pró-inflamatórias (ex: IL-12, TNF- $\alpha$ ) necessárias para a estimulação e proliferação de macrófagos, células B e T CD8<sup>+</sup>. Células T CD8<sup>+</sup> (células T citotóxicas, CTLs) limitam a infecção por reconhecer e destruir células infectadas e por meio da secreção de citocinas que estimulam outras células do sistema imunológico (TRAVASSOS & ALMEIDA, 1993). No entanto, é provável que a vacina ideal no caso da DC seja a combinação de uma resposta capaz de ativar sistematicamente tanto a resposta imune humoral (células B) quanto a imunidade celular (células T), uma vez que ambos, anticorpos líticos (KRAUTZ *et al.*, 2000; BHATIA *et al.*, 2004) e células T (RODRIGUES *et al.*, 2009; TARLETON, 2005) desempenham um papel decisivo no controle da parasitemia.

O sucesso das vacinas na indução da resposta imune protetora contra patógenos microbianos está associado à eficácia da captação dos antígenos da vacina pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) como células dendríticas (DCs) e macrófagos. As APCs têm que internalizar os antígenos de vacinação e transportá-los para os linfonodos de drenagem regionais onde eles processam e apresentam os peptídeos antigênicos em moléculas MHC classe I e classe II, para a ativação de células T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>, respectivamente (ZINKERNAGEL *et al.*, 1997; BANCHEREAU & STEINMAN, 1998, ABDEL-MOTAL *et al.*, 2009).

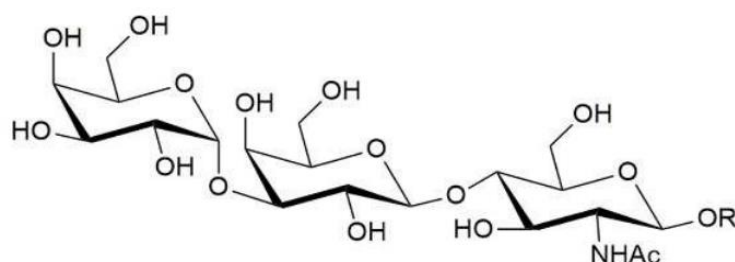
Certos antígenos, como haptenos (moléculas tão pequenas que por si só não são capazes de induzir uma resposta imunológica) peptídeos curtos e carboidratos são nada ou pouco imunogênicos, a menos que conjugados à uma molécula transportadora que forneça o suporte estrutural para a apresentação do antígeno pelas células T, necessária para ativação e maturação das células B (McCLUSKIE *et al.*, 2016). Partículas semelhantes a vírus bacteriófago Q $\beta$  - Q $\beta$ -Virus Like Particle (Q $\beta$ -VLP) - são utilizadas como molécula transportadora. São formadas por múltiplos monômeros de proteínas de capsídeo Q $\beta$ , retendo uma grande quantidade de RNA

bacteriano no núcleo da VLP. Este RNA bacteriano é capaz de ativar o sistema imunológico inato via receptor Toll like (TLR) 7 e 8 encontrado dentro dos endossomas de algumas células e são utilizadas para aumentar as respostas imunitárias de antígenos que são pouco ou nada imunogênicos (AKACHE *et al.*, 2016).

### 1.3 Epítomos $\alpha$ Gal

Os carboidratos apresentados na forma de glicoproteínas, glicolipídios, glicosaminoglicanos ou outros glicoconjugados são conhecidos há muito tempo por desempenhar papéis importantes em uma série de eventos biológicos (LIANG *et al.* 2008)

O epítipo “ $\alpha$ Gal” é uma estrutura glicosídica única, com fórmula molecular Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-R (**Figura 3**), evolutivamente conservada em mamíferos não primatas e em macacos do novo mundo, estando ausente apenas em humanos, símios e macacos do velho mundo, que, como consequência, produzem anticorpos anti- $\alpha$ Gal em grande quantidade (GALILI *et al.*, 1987; GALILI *et al.*, 1988a, MACHER & GALILI, 2007). Todos os mamíferos que sintetizam epítomos  $\alpha$ Gal são imunotolerantes e não podem produzir anticorpos anti- $\alpha$ Gal (GALILI, 2013).

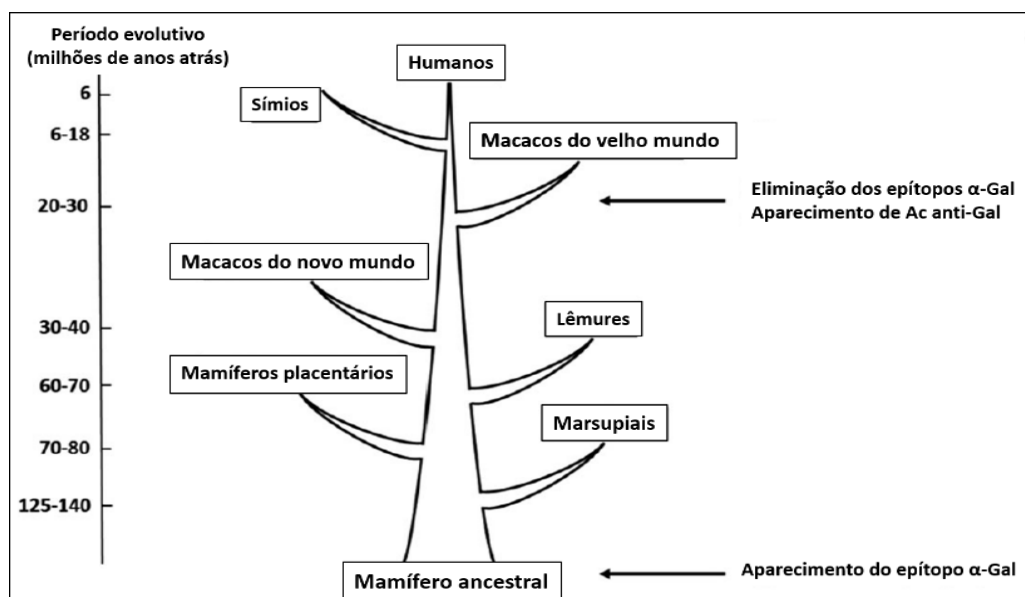


**Figura 3 - Estrutura química do resíduo  $\alpha$ Gal (Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-R).** (Fonte: ANRAKU *et al.*, 2017).

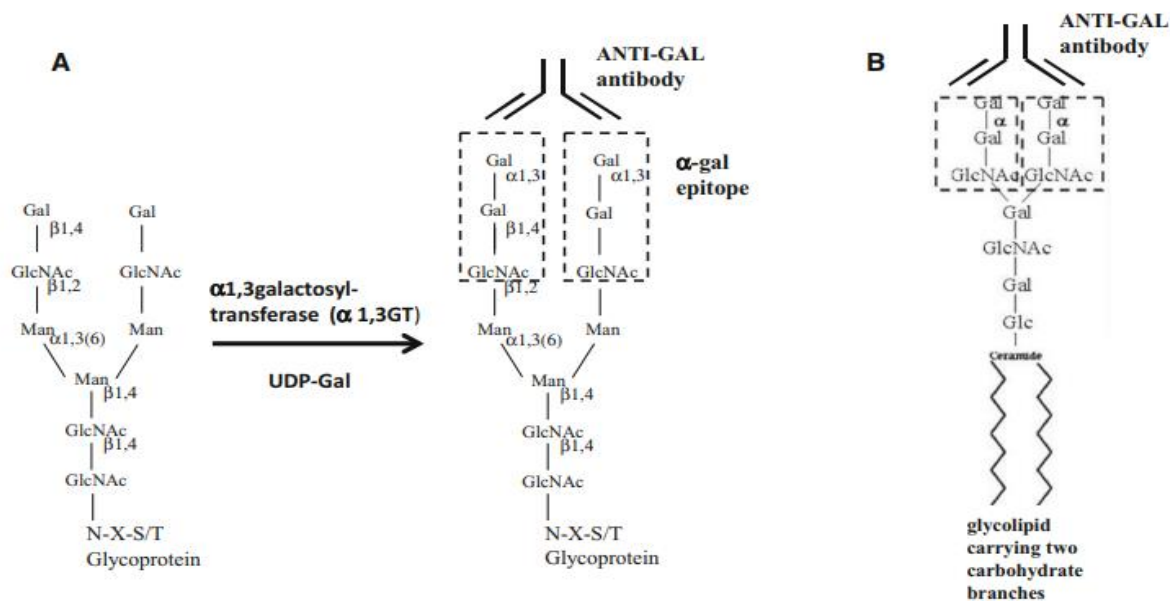
A ausência deste epítipo é o resultado de um evento evolutivo que ocorreu a cerca de 20-28 milhões de anos nos ancestrais dos primatas do velho mundo (**Figura 4**), acarretando na inativação da enzima  $\alpha$ 1-3-galactosyltransferase ( $\alpha$ 1,3GT) (MACHER & GALILI, 2007). Esta enzima catalisa a transferência de um resíduo de galactose de um doador de açúcar, como o difosfato de uridina-galactose (UDP-Gal), através de uma ligação  $\alpha$ 1,3, para um terminal dissacarídeo exposto de N-acetilactosamina (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-R), suportada por uma glicoproteína ou um glicolipídio (**Figura 5**) (BLANKEN & VAN den EIJDEN, 1985). Uma causa para esse evento pode ter sido a pressão evolutiva exercida por um agente infeccioso (vírus, bactéria ou protozoário no velho mundo - Eurásia e África) para a seleção de macacos

nos quais esses genes estavam inativados, ou seja, que produziam o anticorpo anti-  $\alpha$ Gal (GALILI, 2015). Esse evento evolutivo provavelmente foi um fenômeno epidemiológico catastrófico que se correlaciona com a quase completa extinção de hominóides, como indicado no registro fóssil. A inativação deste gene foi um caso único na evolução dos mamíferos, pois resultou na produção de grande quantidade de anticorpos que forneceria proteção imunológica contra patógenos como vírus encapsulados, bactérias e protozoários, prejudiciais aos primatas (GALILI, 2013). Portanto, o epítipo de  $\alpha$ -Gal constitui um potente marcador de agentes externos na imunologia humana (GALILI, 2005).

Alguns protozoários expressam o epítipo  $\alpha$ Gal em sua superfície, como *T. cruzi* e *Leishmania* spp. (AVILA, ROJAS & GALILI, 1989), *Plasmodium falciparum* (RAMASAMY & RAJAKARUNA, 1997, CABEZAS-CRUZ *et al.*, 2017) e *Trypanosoma brucei* (PINGEL *et al.*, 1999). Segundo SOUTO-PADRON (1994), o epítipo  $\alpha$ Gal é encontrado em pequena quantidade nas formas epimastigotas, e em grandes quantidades em tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, o que explica a alta produção do anticorpo em indivíduos infectados.



**Figura 4- Evolução do gene  $\alpha$ 1,3GT, do epítipo  $\alpha$ -Gal e do anticorpo natural anti-  $\alpha$ Gal em mamíferos, conforme ilustrado em uma árvore evolutiva esquemática. As linhas pontilhadas marcam o possível período evolutivo em que primatas ancestrais do Velho Mundo começaram a ser selecionados para a inativação do gene  $\alpha$ 1,3GT. (Adaptado de: GALILI, 2015).**

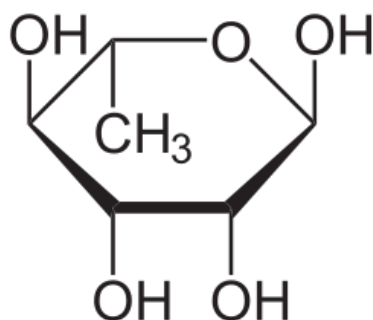


**Figura 5 - Ilustração de epítomos  $\alpha$ -Gal (marcados por retângulos de linhas tracejadas) sobre glicoproteínas (A) e sobre glicolípídios (B).** Como ilustrado, os epítomos  $\alpha$ -Gal, em ambas, são capazes de se ligar ao anticorpo natural anti-  $\alpha$ Gal. (GALILI, 2015).

#### 1.4 Epítomos Rhamnose

Como o  $\alpha$ Gal, a rhamnose (Rham) é um carboidrato relevante biologicamente para o qual um grande segmento da população desenvolve imunidade. A Rham é um deoxi açúcar não observado em humanos, mas muito comum em micróbios e plantas (SHERIDAN *et al.* 2014). Há evidências crescentes de que, em vários fungos, os glicanos contendo Rham estão envolvidos em processos que afetam as interações patógeno-hospedeiro, incluindo adesão, reconhecimento, virulência e formação de biofilme (MARTINEZ *et al.*, 2012). A Rham é caracterizada imunologicamente sendo um O-antígeno encontrado em uma variedade de bactérias (CHEN *et al.*, 2011). O O-antígeno consiste em um esqueleto de carboidrato com cerca de 75% de Rham (KANG *et al.*, 2016). Os oligossacarídeos Rham são unidades constituintes de carboidratos microbianos, heteroglicanos imunogênicos e lipopolissacarídeos, nos quais comumente funcionam como grupos imuno dominantes desses imunógenos (CHEN *et al.*, 2011). A Rham é também um componente da membrana externa de bactérias do gênero *Mycobacterium*, que inclui bactérias causadoras da tuberculose. (CHEN *et al.*, 2011). Por causa de sua abundancia natural e simplicidade estrutural (**Figura 6**), a Rham parece ser uma boa alternativa para vacina de carboidratos. Estudo com parasitos já identificaram resíduos de L-Rham em *Trichomonas vaginalis* (BASTIDA-CORCUERA *et al.*, 2005; RYAN *et al.*, 2011), epimastigotas de *T. cruzi* (TURNOCK & FERGUSON, 2007; ALLEN *et al.*, 2013). No *T. cruzi*, a presença de manutenção das vias biossintéticas de múltiplos passos sugerem que este açúcar

pode desempenhar um papel importante na biologia do parasito (TURNOCK & FERGUSON, 2007). Foi encontrado em grande quantidade também em *Neoparamoeba* sp, uma ameba encontrada em salmões e causadora da doença das guelras amébricas (VILLAVEDRA et al., 2010). Além disto, compostos retirados de plantas contendo estes epitopos se mostraram excelentes antimicrobianos e estudos in vitro mostraram atividade tripanocida contra o *T. brucei* (AYYARI et al. 2014) e ação protetora contra leishmaniose visceral em camundongos (NICO et al., 2012).



**Figura 6** -Estrutura química do resíduo Rhamnose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>). (Fonte: CHEN *et al.*, 2010).

## 1.5 Anticorpos anti- $\alpha$ Gal

O sucesso do sistema imune depende em grande parte da presença de um repertório competente e bem equipado de anticorpos reconhecedores de carboidratos, que são a primeira linha de defesa contra patógenos e removem células e partículas disfuncionais ou malignas (CHENG, 1998; HUFLEJT *et al.*, 2009). Essas imunoglobulinas podem pertencer aos isotipos IgG, IgM, IgA e IgD e são considerados anticorpos naturais, já que são encontrados no soro de indivíduos não imunizados, ou seja, fazem parte do sistema imune inato (HUFLEJT *et al.*, 2009).

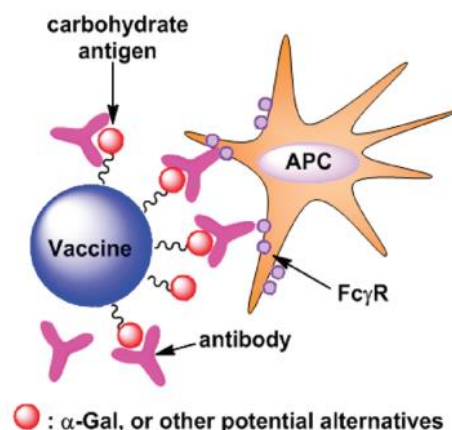
O anti- $\alpha$ Gal é o único anticorpo natural que se sabe estar presente em grandes quantidades em todos os seres humanos (GALILI *et al.*, 1984; ABDEL-MOTAL *et al.*, 2009), constituindo cerca de 1% das imunoglobulinas e é encontrado como isotipos IgG, IgM e IgA (GALILI *et al.*, 1984). Até 1% das células B humanas podem produzir anti-  $\alpha$ Gal; no entanto, a maioria dessas células são quiescentes e somente as células presentes ao longo do trato gastrointestinal produzem o anticorpo em resposta às bactérias ali presentes normalmente (GALILI *et al.*, 1988). Este reconhecimento ocorre em maior grau quando o indivíduo é infectados por *T. cruzi*, que quando não infectados (ALMEIDA *et al.*, 1994; ASHMUS *et al.*, 2013).



É provável que a tolerância anti- $\alpha$ Gal seja induzida em nível de desenvolvimento de células B na medula óssea, por deleção ou edição de receptor. Esse mecanismo é sugerido com base na observação de estudos em células B em indivíduos dos grupos sanguíneos A ou B, que apresentam estrutura antigênica semelhante ao epítipo  $\alpha$ -Gal (GALILI, 2013). O anticorpo anti-grupo sanguíneo B, está presente apenas nos indivíduos do tipo A e 0 e é majoritariamente da isotipo IgM. O anticorpo anti- $\alpha$ Gal está presente nos soros de todos os grupos sanguíneos e é principalmente um anticorpo IgG (GALILI *et al.* 1984)

O anticorpo anti- $\alpha$ Gal é capaz de se ligar *in vivo* aos epítipos  $\alpha$ Gal em glicolípideos e glicoproteínas da superfície celular (**Figura 5**) apresentando uma especificidade de ligação por terminais Gal $\alpha$ 1-3Gal (GALILI *et al.*, 1985). A especificidade desse anticorpo está relacionada a todo conjunto que compõe o epítipo  $\alpha$ Gal, uma vez que se retirado o grupamento N-acetil do trissacarídeo, os anticorpos gerados possuem menor especificidade quando comparada ao epítipo intacto (ANRAKU *et al.*, 2017). A elevada especificidade desses anticorpos pelo epítipo  $\alpha$ -Gal elimina o caráter polirreativo observado naturalmente em alguns anticorpos.

Uma vez que o anti- $\alpha$ Gal humano se liga aos epítipos de  $\alpha$ Gal nas células, sua porção Fc se liga prontamente ao FcR III (CD64) nas CDs e macrófagos (**Figura 7**). Essa interação induz a fagocitose efetiva das células opsonizadas por anticorpos anti- $\alpha$ Gal pelas APCs, conforme demonstrado em um estudo onde a absorção de ovoalbumina por APCs foi consideravelmente maior quando opsonizados por anti- $\alpha$ Gal do que quando a endocitose ocorre aleatoriamente, aumentando assim a quantidade de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> específicas (ABDEL-MOTAL *et al.*, 2009).



**Figura 7 - Esquema da resposta à vacina contendo antígeno de carboidrato mediada por anticorpos com imunogenicidade aumentada (Fonte: CHEN *et al.*, 2010).**

Na infecção por *T. cruzi*, a lise direta do parasito pelos anticorpos anti- $\alpha$ Gal é um mecanismo de proteção na fase aguda (GAZZINELLI *et al.*, 1991), no entanto, o parasito consegue escapar dessa destruição via anticorpo lítico, penetrando nas células do hospedeiro.

Em indivíduos infectados por *T. cruzi* observa-se um aumento dos títulos de anticorpos anti- $\alpha$ Gal quando comparados com não-infectados (ALMEIDA *et al.*, 1991; GAZZINELLI *et al.*, 1991; GONZÁLEZ *et al.*, 1995). Este aumento acontece progressivamente, de maneira lenta no início da infecção, com pico de produção no 30º dia de infecção (GRAUERT *et al.*, 1993). Isto acontece devido a presença deste epítipo na membrana do tripomastigota do parasito (BRETANA *et al.*, 1992), em GIPLs e lipofosfoglicanos (LPGs) (AVILA, ROJAS & GALILI, 1989; ALMEIDA *et al.*, 1994). Além disso, já foi mostrado em cultura de células VERO que formas intracelulares continuam a produzir e liberar GIPLs e LPGs contendo o epítipo  $\alpha$ -Gal, podendo estimular o sistema imune para uma produção contínua de elevados títulos de anticorpos anti- $\alpha$ Gal em pacientes chagásicos (SOUTO-PADRON *et al.*, 1994). No entanto, quando o paciente é tratado com Benzonidazol no estágio inicial de cronicidade, seu título é consideravelmente reduzido sugerindo que eles também podem ser úteis para monitorar pacientes após o tratamento medicamentoso (DE MARCHI *et al.*, 2011). Como o anti- $\alpha$ Gal é um anticorpo muito abundante em humanos, ele pode ser aproveitado para usos clínicos, como desenvolvimento de vacinas anti-tumorais autólogas, aceleração de cicatrização de feridas e provavelmente na regeneração de miocárdio isquêmico, tecido nervoso lesionado e outras lesões internas (GALILI, 2013b).

## **1.6 Anticorpos anti-Rhamnose**

Estudos para determinação do perfil de anticorpos do soro humano constataram que além dos anticorpos anti- $\alpha$ Gal existem vários anticorpos anti-carboidratos inesperados em níveis relativamente elevados (OYELARAN *et al.*, 2009; HUFLEJT *et al.*, 2009; SARKAR *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2017), aumentando o leque de possíveis antígenos vacinais. Entre eles estão anticorpos anti-mono-Lrhamnose (anti-Rham), monossacarídeo desoxi simples não expresso em células humanas, mas prevalente em micróbios e plantas.

O anti-Rham é altamente específico para o antígeno e formam complexos relativamente estáveis (LI *et al.*, 2016). Elevados títulos foram relatados para uma grande coleção de amostras de soro de vários indivíduos de diferentes faixas etárias (SARKAR *et al.*, 2010) indicando que o Rham pode ser um bom antígeno para o recrutamento de anticorpos e ativação da citotoxicidade celular mediada pelo complemento (LI *et al.*, 2016). Um estudo realizado com

*pools* de soros humanos e murinos confirmou a alta taxa de IgG e IgM anti-Rham, sendo no caso dos humanos, os títulos de IgG anti-Rham podem ser até quatro vezes maiores que os títulos de IgG anti- $\alpha$ Gal (CHEN *et al.*, 2011, SHERIDAN *et al.* 2014). A observação de que estes anticorpos anti-Rham apresentam *pools* de IgG e IgM sugere que eles têm capacidade de ativar a imunidade humoral e celular. No entanto, o título de anti-Rham em camundongos é naturalmente baixo, a não ser que estes sejam imunizados, nesse caso, são capazes de mimetizar o aumento de anticorpos que acontece nos humanos (CHEN *et al.*, 2011; SHERIDAN *et al.* 2014; KANG *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016; KARMAKAR *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2017).

KARMAKAR e colaboradores (2016) desenvolveram uma vacina a partir de lipossomas e Rham e após imunização de camundongos C57/BL6 WT, o resultado sugere que o epítipo de Rham na vacina pode formar imunocomplexos com os anticorpos anti-Rham *in vivo*, seguido por captação eficiente de antígeno em CDs, levando à reação cruzada em moléculas de MHC classe I. Neste caso, foi possível induzir células TCD8<sup>+</sup> e ainda gerar resposta humoral, enquanto que apenas Rham apresentou uma fraca reação cruzada. Com base nisto, a Rham, juntamente com o  $\alpha$ Gal se mostraram excelentes candidatos para o desenvolvimento de estratégias no recrutamento imunológico.

## 1.7 Q $\beta$ - Virus Like Particle (Q $\beta$ -VLP)

Os carboidratos são geralmente pouco imunogênicos e, em geral, os epítopos de carboidratos sozinhos não ativam as células T auxiliares (SARKAR *et al.*, 2010) portanto, é necessário para o desenvolvimento de uma vacina de carboidrato, um método que melhore sua imunogenicidade.

As partículas semelhantes a vírus (VLPs) são estruturas macromoleculares derivados do bacteriófago Q $\beta$  e têm sido usados extensivamente como plataformas biomoleculares, por exemplo, nanotransportadores e vacinas (HOVLID *et al.*, 2014; LEUNG *et al.*, 2017). Para aumentar a imunogenicidade em vacina viral não replicantes de antígenos, tenta-se imitar as propriedades do patógeno em questão. Como exemplos temos a vacina “Inflexal” contra o vírus da Influenza, que é um virossoma que incorpora a proteína hemaglutinina viral em lipossomas, e a vacina “Engerix B” contra hepatite B que apresenta características de VLP e lipossomas, pois durante o processo de automontagem, os lipídeos são incorporados às partículas acinas para Influenza A (H1N1) (LOW *et al.*, 2014),

Uma das plataformas disponíveis para apresentação de antígenos vacinais que mais se assemelha às propriedades do vírus são as VLPs que também podem ser usadas para exibir

antígenos que não estão relacionados com o próprio VLP, e, portanto, podem induzir respostas de anticorpos ao antígeno escolhido. A superfície altamente repetitiva dos VLPs induz uma potente resposta com anticorpos e os antígenos exibidos nestas VLPs assumem uma imunogenicidade semelhante à das partículas (BACHMANN & JENNINGS,2010). Devido à essa elevada densidade de epítomos em sua superfície, podem ser reconhecidos e apresentados ao sistema imunológico por células apresentadora de antígenos, estimulando assim a imunidade humoral e celular de forma eficaz através de vias semelhantes à dos patógenos originais (KELLER *et al.*, 2010). No entanto, os adenovírus não são capazes de integrar o seu DNA ao cromossomo da célula hospedeira. Outro aspecto importante destas partículas é que elas podem ser altamente estáveis frente às variações de temperatura, pH e composição do solvente (ASHCROFT *et al.*, 2005; JOHNSON *et al.*, 2007), podendo passar por modificações químicas e mesmo assim manter muitas características de suas moléculas biológicas originais (FIEDLER *et al.*, 2012). Esta característica é muito importante em casos de pandemias, já que as VLPs podem ser armazenadas e apenas o antígeno de escolha precisa ser produzido e conjugado à partícula (LOW *et al.*, 2014). VLP mostrou ser promissor em estudos em andamento, como o caso da vacina contra o Mal de Parkinson e doença de Alzheimer. Estas vacinas se apresentam como uma ferramenta ideal para atingir moléculas aberrantes já que são capazes de aumentar as respostas de anticorpos contra auto-antígenos, com segurança e excelente tolerabilidade (DOUCET *et al.*, 2017).

VLPs são sistemas de automontagem que formam espontaneamente partículas em forma de vírus após a expressão de uma ou várias proteínas virais e sua simetria reflete a simetria original do vírus. Proteínas de envelope Q $\beta$  montam VLP icosaédricas (BACHMANN & JENNINGS, 2010) compostas de subunidades proteicas geneticamente controladas com altos graus de polivalência, grande estabilidade e tamanho e forma monodispersos (RHEE *et al.*, 2012; HOVLID *et al.*, 2014). VLPs não podem replicar, devido a ausência de replicase e ácidos nucleicos, não apresentando riscos à saúde do indivíduo. Esta característica é obtida através da recuperação somente de proteínas estruturais do capsídeo com retirada do material genético, ou pela expressão de proteínas estruturais de forma heteróloga (SCHWARZ & DOUGLAS, 2015). No caso do Q $\beta$ -VLP, ocorre o agrupamento espontâneo destas partículas ao redor de fragmentos de RNA ou DNA na presença de estruturas polianiónicas. Cada Q $\beta$ -VLP contém 180 subunidades e uma seleção aleatória de diferentes espécies de RNA derivadas de *Escherichia coli* (*E. coli*) (BACHMANN & JENNINGS,2010; LOW *et al.*, 2014). Este RNA pode ser substituído de modo a manipular o estímulo TLR dado às VLPs (BACHMANN & JENNINGS,2010). VLPs variam em tamanho entre 20-200nm, o ideal para a captação e trânsito

rápido para os órgãos linfóides, onde podem interagir com linfócitos B e outras células apresentadoras de antígenos (KHAN *et al.*, 2015). Dessa forma, as VLPs oferecem as vantagens de uma partícula viral, mas sem o risco da doença, se mostrando uma alternativa promissora para o desenvolvimento de agentes terapêuticos ou de diagnóstico, apresentando antígenos e estimulando o sistema imunológico (SCHWARZ & DOUGLAS, 2015).

O Q $\beta$ -VLP tem sido utilizado com segurança em alguns ensaios clínicos em humanos. Temos exemplos de vacina antitabagismo com o Q $\beta$  ligado à nicotina, produzindo anticorpos que, em grande quantidade, impedem que a nicotina ultrapasse a barreira hematoencefálica (MAURER & BACHMANN, 2006; CORNUZ *et al.*, 2008). Um experimento piloto mostrou que a vacina AngQ $\beta$  reduziu a pressão arterial sanguínea (AMBÜHL *et al.*, 2007). Até o momento temos vacinas humanas licenciadas à base de VLPs contra três doenças causadas por infecções virais: hepatite B, câncer do colo de útero, causado por Papilomavírus Humano (HPV) e hepatite E (Zhang *et al.*, 2015).

Trabalhos com modelos experimentais mostraram possibilidades de vacinas para a prevenção de doenças inflamatórias com o uso de Q $\beta$ -TNF (SPOHN *et al.*, 2007), de obesidade, com o Q $\beta$  ligado à peptídios gástricos inibitórios (FULURIJA *et al.*, 2008) e malária, com o Q $\beta$  ligado à proteína circunsporozoíta (CSP) (KHAN *et al.*, 2015). Já está em análise vacinas com ações antitumorais, como as baseadas em GM2 e TACA (YIN *et al.*, 2016; SUNGSUWAN *et al.*, 2017), além de pesquisas de vacinas Q $\beta$ -VLP baseadas em  $\alpha$ Gal para leishmaniose pelo grupo (MOURA *et al.*, 2017)

## **1.8 Animais geneticamente deficiente para a enzima $\alpha$ -1,3-galactosiltransferase**

Um grande problema clínico no transplante de órgãos é a escassez de doadores humanos e os efeitos colaterais do uso prolongado de drogas imunossupressoras. O xenotransplante de porcos em humanos surgiu como uma solução viável para este problema (ONZUKA *et al.*, 2008). Anticorpos anti- $\alpha$ Gal são os anticorpos primários responsáveis pela rejeição hiperaguda (HAR) de órgãos não humanos (porcinos) em humanos, sendo o principal obstáculo para transplantes interespecie. Esta rejeição ocorre quando os anticorpos anti- $\alpha$ Gal preexistente induz uma rápida destruição do enxerto por meio do complemento. (GALILI, 1993b. POSEKANY *et al.*, 2002). Os modelos experimentais utilizados para estudar a rejeição de xenoenxertos mediada por anticorpos anti- $\alpha$ Gal são os primatas do Velho Mundo (COWAN & D'APICE, 2003) que, assim como os humanos, não possuem a enzima  $\alpha$ 1,3GT responsável pela síntese do epítipo  $\alpha$ -Gal e conseqüentemente não possuem anticorpos anti- $\alpha$ Gal (GALILI

*et al.*, 1988a). No entanto, questões éticas e alto custo de manutenção fizeram com que os pesquisadores (TEARLE *et al.*, 1996) desenvolvessem um modelo animal de melhor manejo, manutenção e custo para este estudo (COWAN & D'APICE, 2003).

Camundongos C57/BL6  $\alpha 1,3GT$  geneticamente deficientes foram gerados a princípio por meio da interrupção do gene da enzima  $\alpha 1,3GT$  em células estaminais embrionárias, com o intuito de testar se a deficiência deste epítipo afetaria a fertilidade desses animais (THALL, MALÝ & LOWE, 1995). Animais geneticamente deficientes para o gene da enzima  $\alpha 1,3GT$  continuam férteis quando comparados a animais  $\alpha 1,3GT$  selvagens, indicando que o epítipo Gal $\alpha 1-3Gal$  não é essencial para a fecundação nesta espécie, sendo assim, possível gerar um modelo animal ideal para estudar abordagens que possam diminuir a HAR dependente de anticorpos anti- $\alpha Gal$  nos transplantes de órgãos (THALL, MALÝ & LOWE, 1995). Posteriormente um outro grupo de pesquisa interrompeu o exon nove do gene da enzima  $\alpha 1,3GT$ , que codifica para um domínio catalítico dessa enzima. Os camundongos nasceram viáveis e férteis (TEARLE *et al.*, 1996). Não se sabe ao certo o papel deste epítipo no organismo do animal, mas a única consequência fenotípica observada foi a catarata (TEARLE *et al.*, 1996; DAHL *et al.*, 2006) além da expressão de diferentes proteínas com funções variadas (THORLACIUS-USSING *et al.*, 2013). Além de estudos envolvendo transplantes de órgãos, esses animais têm sido utilizados também para o desenvolvimento de terapias contra o câncer (UNFER, HELLRUNG & LINK Jr, 2003; POSEKANY *et al.*, 2004; DERIY *et al.*, 2005; ROSSI *et al.*, 2005; ROSSI *et al.*, 2008; ABDEL-MOTAL, WIGGLESWORTH & GALILI, 2009b) e em estudos de aceleração da cicatrização de queimaduras e feridas (GALILI, WIGGLESWORTH & ABDEL-MOTAL, 2010; WIGGLESWORTH *et al.*, 2011; GALILI, 2017).

Um estudo executado pelo nosso grupo relacionou a exposição à picada do carrapato *Amblyoma sculptum* (o principal carrapato que infesta seres humanos no Brasil) e a produção de IgE específica anti-  $\alpha Gal$  à alergia à carne vermelha no Brasil. Neste estudo, camundongos  $\alpha 1,3GT-KO$  e o Q $\beta$ -VLP apresentando cerca de 540 epítipos de  $\alpha$ -Gal foram utilizados para investigar a presença  $\alpha$ -Gal na saliva deste carrapato (ARAÚJO *et al.*, 2016). Estes animais  $\alpha 1,3GT-KO$  também foram usados para verificar se a produção de anticorpos anti-  $\alpha Gal$  que ocorre quando expostos à bactéria *E. coli*, contribui para a defesa natural contra o *Plasmodium* spp., tendo sido evidenciado uma resposta imunológica protetora desencadeada pela microbiota intestinal do animal contra a transmissão do parasito (YILMAZ *et al.*, 2014).

Em humanos, um dos principais mecanismos de defesa contra o *T. cruzi* é o direcionamento de anticorpos líticos que apresentam especificidade para o terminal  $\alpha$ -Gal dos tripomastigotas (ALMEIDA *et al.*, 1991; GAZZINELLI *et al.*, 1991). Segundo RODRIGUES (2017), uma das prerrogativas de uma vacina profilática ideal é que ela seja testada em modelos que mimetizem a patogenia e a resposta imune do homem, caso contrário, a vacina efetiva para a DC experimental pode não significar efetividade na DC humana. No entanto, estudos sobre a infecção experimental pelo *T. cruzi* são realizados em animais  $\alpha$ 1,3GT-WT que não mimetizam a resposta imune desencadeada após a infecção. Estes estudos podem não esclarecer a participação dos anti- $\alpha$ Gal, que seria um dos principais mecanismos protetores contra o parasito, evidenciado pela produção abundante de anticorpos anti- $\alpha$ Gal (ALMEIDA *et al.*, 1991; GAZZINELLI *et al.*, 1991; GONZÁLEZ *et al.*, 1995; LaTEMPLE & GALILI, 1998; CHIANG *et al.*, 2000). Por este motivo o animal  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferase KO foi escolhido para desenvolvimento deste estudo.

*Justificativa*



## 2 JUSTIFICATIVA

O tratamento de primeira escolha da DC no Brasil atualmente baseia-se no emprego do BZ, que apesar de ser altamente eficaz na fase aguda da infecção, tem eficácia parcial na fase crônica, além de apresentar efeitos colaterais (DIAS, 1992; MURTA & ROMANHA, 1998; WHO, 2002; URBINA & DOCAMPO, 2003; ANDRADE et al., 2004). Além disso, isolados de *T. cruzi* resistentes ao BZ já foram relatados (UPHOFF & DREXLER, 1998). Juntamente a este fato, ainda não existe vacina humana ou imunoterapia para prevenir ou tratar os pacientes na fase crônica da doença. Sendo assim, há uma grande necessidade de desenvolver uma vacina, assim como novas drogas e intervenções terapêuticas para a DC.

Embora vários estudos tenham sido realizados utilizando modelos animais diferentes que reproduzem alguns aspectos da doença, modelos experimentais que demonstrem simultaneamente os aspectos parasitológicos e clínicos em associação com aspectos imunológicos ainda são necessários (PEREIRA *et al.*, 2014). Muitos estudos de infecção experimental pelo *T. cruzi* são realizados com animais que não representam de maneira real a resposta imune desencadeada após a infecção, quando comparadas às respostas de humanos infectados. Com exceção de seres humanos e primatas não humanos do velho mundo, camundongos e todos os outros mamíferos expressam glicanos  $\alpha$ Gal em suas células e tecidos, sendo, portanto, tolerantes ao epítipo  $\alpha$ Gal na produção de anticorpos. Com o objetivo de superar esse problema, a utilização de camundongos geneticamente modificados para não expressarem epítopos  $\alpha$ Gal por interrupção da enzima UDP-galactose: beta-D-galactosil-1,4-N-acetil-D-glucosaminide alfa-1,3-galactosiltransferase ( $\alpha$ GalT-KO), pode contribuir como um modelo mais próximo aos seres humanos em relação à resposta imune e desenvolvimento da doença na infecção pelo *T. cruzi* (CAMARGO, 1964).

Em indivíduos infectados pelo *T. cruzi* observa-se um aumento dos títulos de anticorpos anti- $\alpha$ Gal em indivíduos infectados, quando comparados com não-infectados (ALMEIDA et al., 1991; GAZZINELLI et al., 1991; GONZÁLEZ et al., 1995). Isto acontece devido a presença deste epítipo na membrana do tripomastigota do parasito (BRETAÑA et al., 1992), em GIPLs e lipofosfoglicanos (LPGs) (AVILA, ROJAS & GALILI, 1989; ALMEIDA et al., 1994). Este anticorpo é responsável pela a lise direta do parasito, um importante mecanismo de proteção na fase aguda da DC (GAZZINELLI et al., 1991). Outro carboidrato presente na superfície do tripomastigota de *T. cruzi* capaz de induzir produção de anticorpos é o Rham. Uma análise profunda da resposta destes animais após a infecção com diferentes isolados de *T. cruzi* certamente contribuirá para os próximos passos no estudo de novos mecanismos para o

desenvolvimento de vacinas e tratamentos da DC. Estes carboidratos foram reconhecidos e selecionados por micro-arranjos dentre 406 carboidratos de *T. cruzi* expostos em placas de ELISA de fluorescência.

O estudo de imunogenicidade e vacinal contou com epítomos de glicano altamente imunogênicos, contendo  $\alpha$ Gal e/ou Rhamnose sintéticos acoplados a uma partícula viral modificada VLP “*virus like particle*”, elaborada por Alexandre Marques e produzido por M.G. Finn, do Instituto de Tecnologia da Georgia, EUA. Estas partículas incorporam características imunológicas importantes de vírus, que incluem a indução da imunidade inata através da ativação de receptores (PRRs) de PAMPs (Padrão de reconhecimento Molecular de patógenos). *VLPs* podem ser utilizadas para apresentar epítomos estranhos ao sistema imune, sendo capazes de melhorar a exposição do epítomo acoplado, permitindo uma ligação diferencial e mais específica, se consolidando como uma plataforma vacinal segura e eficaz para induzir potente respostas de células B e T. Elas transportam a informação genética de forma não replicativa e são interessantes por poderem ser produzidas em grande escala e a baixo custo. Durante a última década, três vacinas profiláticas *VLPs* foram registradas para uso humano, enquanto outras 12 vacinas entraram em desenvolvimento clínico (GARY & MARTIN, 2008).

Este estudo tem o potencial para criar a base experimental em um modelo de animais semelhantes na resposta imune humoral de seres humanos para o desenvolvimento da primeira vacina humana eficaz para impedir a DC. Além disso, a vacina também pode ter efeito terapêutico em indivíduos infectados com *T. cruzi*.

***Objetivos***

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Avaliar a eficácia de vacinas virais constituídas por carboidratos presentes na superfície de formas tripomastigotas do *T. cruzi*, como  $\alpha$ Gal e Rham, acoplados ao bacteriófago modificado Q $\beta$  “*virus like particle*”, em animais geneticamente deficientes para  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase ( $\alpha$ GalT-KO).

#### 3.2 Específicos

- ✓ Avaliar diferenças na resposta frente à infecção dos animais selvagens e geneticamente deficientes para  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase
- ✓ Avaliar a imunogenicidade da vacina Q $\beta$ ( $\alpha$ -Gal)<sub>180</sub> em animais  $\alpha$ GalT-KO
- ✓ Confirmar a especificidade da ligação dos anticorpos anti- $\alpha$ Gal pela remoção do resíduo terminal  $\alpha$ Gal.
- ✓ Determinar a dose da vacina de Q $\beta$ - $\alpha$ Gal
- ✓ Imunizar os animais  $\alpha$ GalT-KO com partículas vacinais contendo,  $\alpha$ Gal, rha,  $\alpha$ Gal/rha ou Glu
- ✓ Desafiar esses animais com as cepas Colombiana e clone Cl-Brener
- ✓ Avaliar a parasitemia, peso, sobrevivência, níveis de anticorpos anti- $\alpha$ Gal, análise semi-quantitativa da inflamação e ninhos de amastigotas

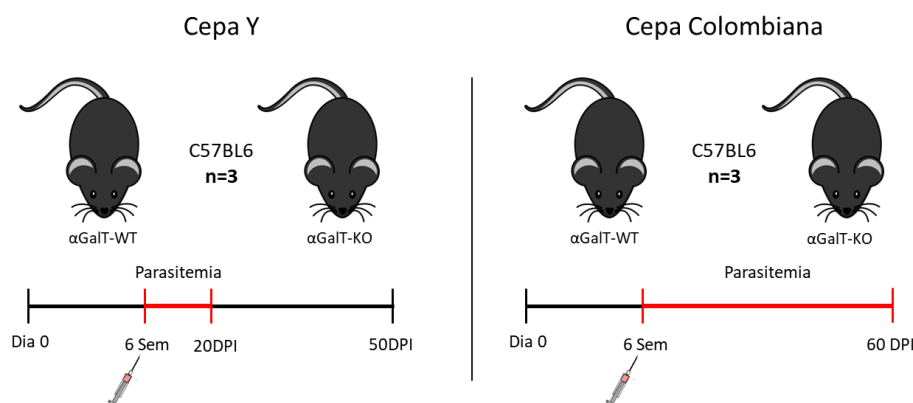
## ***Materiais e Métodos***

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento experimental

#### 4.1.1 Avaliação do modelo experimental

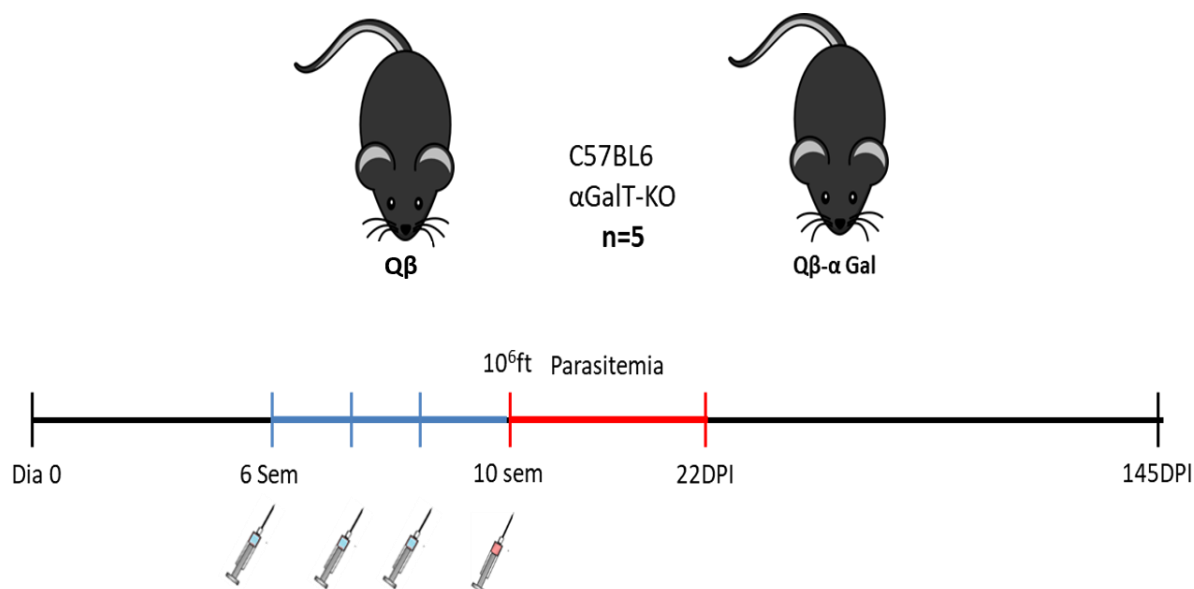
Com o intuito de analisar se os animais modificados apresentam diferença na resistência à infecção quando comparados aos animais selvagens, foram formados grupos de três animais selvagens ( $\alpha$ 1,3GT-WT) e três animais geneticamente deficientes ( $\alpha$ 1,3GT-KO). Ao atingirem seis semanas de vida estes animais foram infectados com diferentes concentrações ( $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$ ) das cepas Y e Colombiana. A parasitemia da cepa Y foi realizada diariamente, do 5º ao 20º dia pós infecção (DPI), e a necrópsia ocorreu com 50 DPI. Já a cepa Colombiana foi acompanhada de quatro em quatro dias, do dia 12º ao 60º dia pós infecção, quando ocorreu também a necrópsia dos animais, como mostrado na **Figura 8**:



**Figura 8 - Avaliação do perfil de resistência à infecção com cepas Y e Colombiana entre os animais selvagens (WT) e geneticamente deficientes para  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferase**

#### 4.1.2 Avaliação da imunogenicidade da vacina $Q\beta(\alpha-Gal)_{180}$

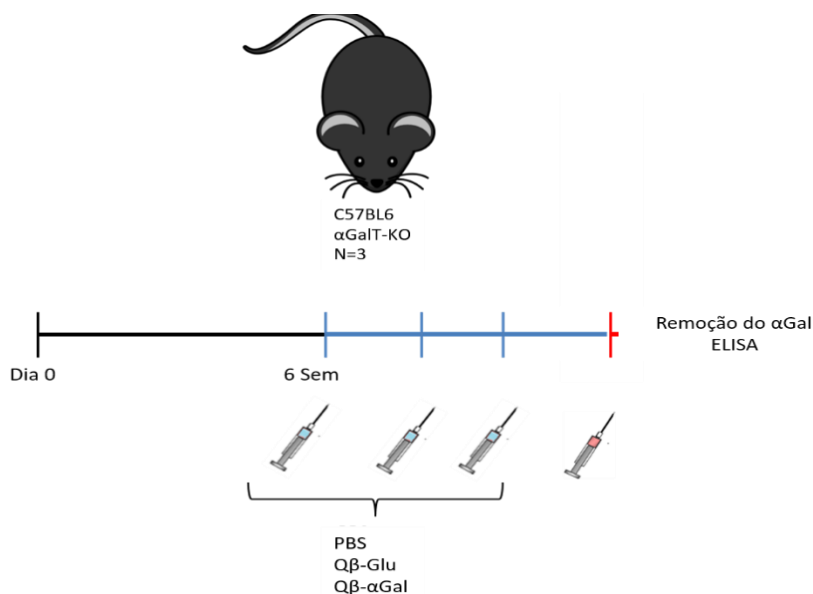
Para avaliar a eficiência da partícula nos animais deficientes na enzima  $\alpha$ 1,3GT e, conseqüentemente na produção de anticorpos anti- $\alpha$ Gal, um grupo de 5 animais foi imunizado com doses semanais por 3 semanas do  $Q\beta$  apresentando ou não (grupo controle) 180 moléculas de  $\alpha$ -Gal [ $Q\beta(\alpha Gal)_{180}$ ]. Estes animais foram infectados com  $10^6$  formas tripomastigotas sanguíneo da cepa Y. A parasitemia e peso foi analisada diariamente entre os dias 5 e 22. Estes animais tiveram o sangue recolhido para o acompanhamento dos níveis de anticorpos anti-  $\alpha$ Gal uma semana após a imunização, com 20 dias de infecção e ao final do experimento, com 145 DPI, quando também foi colhido o coração para análise histológica. (**Figura 9**).



**Figura 9 – Análise da imunogenicidade da partícula Q $\beta$ -VLP com 180 resíduos do carboidrato  $\alpha$ Gal acoplados [Q $\beta$ ( $\alpha$ Gal)<sub>180</sub>]**

#### 4.1.3 Confirmação da especificidade do anticorpo IgG anti- $\alpha$ Gal

Percebendo o aumento dos anticorpos após a imunização e com a chegada de um novo lote da partícula, agora contendo 540 resíduos de  $\alpha$ Gal, foi feita a conferência da especificidade desses anticorpos para saber se é anti- $\alpha$ Gal ou anti-Q $\beta$ . Foram formados grupos de três animais que receberam três doses semanais de Q $\beta$ - $\alpha$ Gal, Q $\beta$ -Glu ou PBS. Uma semana após a imunização, foi coletado o sangue dos animais para a conferência da especificidade (**Figura 10**).

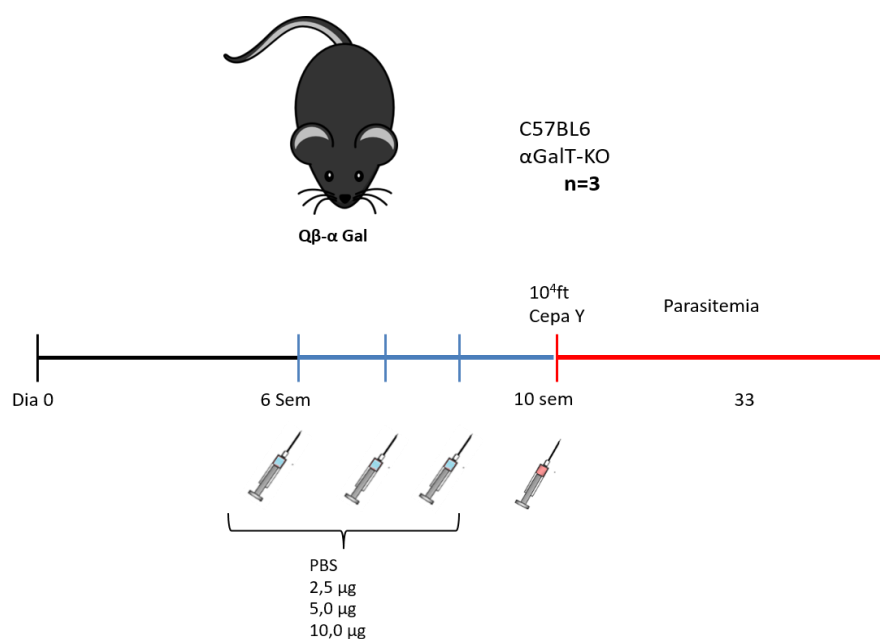


**Figura 10- Confirmação da especificidade do anticorpo produzido após imunização com 540 resíduos de  $\alpha$ Gal acoplados à Q $\beta$ -VLP**

#### 4.1.4 Determinação da dose de Q $\beta$ - $\alpha$ Gal a ser administrada

Comprovando a presença de anticorpos após a imunização, o próximo passo foi determinar a melhor dose do Q $\beta$ ( $\alpha$ Gal)<sub>540</sub> a ser administrada. Para isso foram usados 12 animais  $\alpha$ 1,3GT-KO. Estes animais receberam três doses semanais de 2,5 $\mu$ g, 5 $\mu$ g e 10 $\mu$ g ou PBS como controle.

Os animais foram infectados com 10<sup>4</sup> ft da cepa Y do *T. cruzi* e eutanasiados com 33 dias de infecção (DPI). Foi feito o acompanhamento da parasitemia, peso corporal e sobrevivência, e no momento da eutanásia foi coletado o coração para as análises da carga parasitária e análise histológica com relação à inflamação, fibrose e presença de ninhos de amastigotas. O sangue foi recolhido para o acompanhamento dos níveis de anticorpos anti- $\alpha$ Gal uma semana após a imunização, e ao final do experimento (**Figura 11**).



**Figura 11:** Determinação da dose de imunização da vacina contendo partículas Q $\beta$ -VLP com 540 resíduos do carboidrato  $\alpha$ Gal acoplados [Q $\beta$ ( $\alpha$ Gal)<sub>540</sub>]

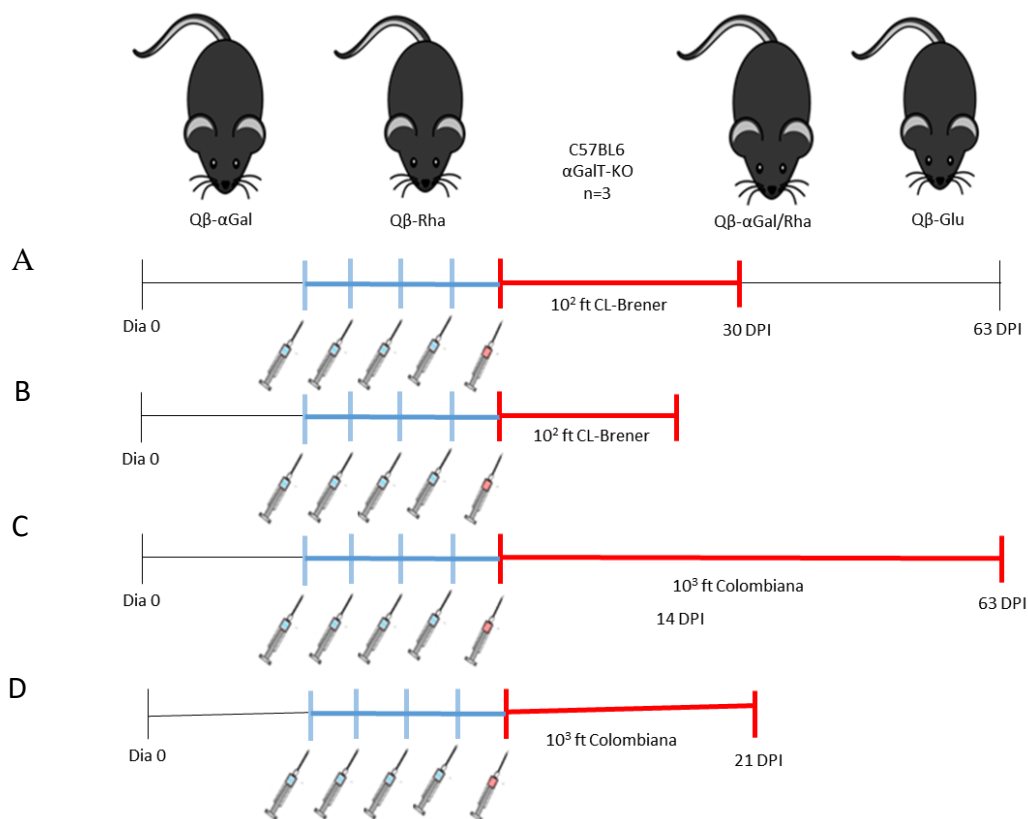
#### 4.1.5 Infecção com cepa Colombiana e clone Cl-Brener em diferentes tempos de infecção

Para analisar o comportamento da infecção pelo clone CL-Brener nos animais imunizados, foram formados grupos contendo três animais geneticamente deficientes ( $\alpha$ 1,3GT-KO). Ao atingirem 6-8 semanas de vida estes animais foram imunizados com Q $\beta$  contendo 540 partículas dos epítomos em questão (5 $\mu$ g animal/dose) semanalmente por quatro semanas. Foram montados quatro grupos de imunizações: Q $\beta$ - $\alpha$ Gal, Q $\beta$ -Rham, Q $\beta$ -  $\alpha$ Gal/Rham e Q $\beta$ -



Glu. Sete dias após a imunização, o sangue do animal foi coletado para confirmação da presença de anticorpos e após 5-7 dias, estes animais foram infectados com o inóculo de  $10^2$  ft. O mesmo protocolo foi utilizado para a infecção com a cepa Colombiana, no entanto os grupos foram formados por três animais e o inóculo de infecção foi de  $10^3$  ft. A parasitemia do clone CL-Brener foi realizada a cada dois dias do 8° ao 30° (**Figura 12A**) ou do 8° ao 14° DPI (**Figura 12B**). Já a parasitemia da cepa Colombiana foi realizada 4-4 dias do 12° ao 60° (**Figura 12C**) ou do 12° ao 21° DPI (**Figura 12D**). Em ambos os experimentos a necrópsia ocorreu no pico da parasitemia ou com 63 DPI, como mostrado na **Figura 12**.

Os diferentes tempos de análise foram escolhidos com o intuito de saber quais mudanças ocorrem no pico e no final da parasitemia. Ao longo dos experimentos foram avaliados a parasitemia, alteração do peso corporal, sobrevivência e, após necrópsia, foi colhido o soro para analisar níveis de anticorpos anti- $\alpha$ Gal e coração para análise histológica



**Figura 12 - Acompanhamento da infecção de animais  $\alpha 1,3GT-KO$  com a cepa Colombiana e clone CL-Brener de *T. cruzi***

## 4.2 Considerações éticas na experimentação animal

Todas as atividades de pesquisas envolvendo modelos animais foram conduzidas de acordo com princípios éticos de boas práticas em experimentação animal, sendo que o projeto

foi aprovado previamente pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, conforme certificado pelo Protocolo nº 255/2013

### **4.3 Animais**

Camundongos (*Mus musculus*) com fundo genético C57BL/6 selvagens ou geneticamente deficientes para o gene da enzima  $\alpha 1,3GT$  (Gentilmente doados pelo Prof. Diretor Peter Cowan, ST Vincent Hospital, Australia e Dr. Janda, Scripps USA), ( $\alpha 1,3GT$ -WT e  $\alpha 1,3GT$ -KO respectivamente), fêmeas foram utilizados para os experimentos, com idade variando de seis a oito semanas e peso variando entre 18 e 22 gramas. Os animais foram alojados em gaiolas de 30,3 X 19,3 X 12,6 cm com até cinco animais cada e mantidos no biotério com ciclos controlados de 12 horas de luz/escuro com ração padrão (Presence) e água *ad libitum* durante todos o experimento e mantido com boas condições de higiene, no biotério do Laboratório de Biologia do *T. cruzi* e DC, pertencente ao Comitê do Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG.

### **4.4 Cepas do *Trypanosoma cruzi* e manutenção dos parasitos**

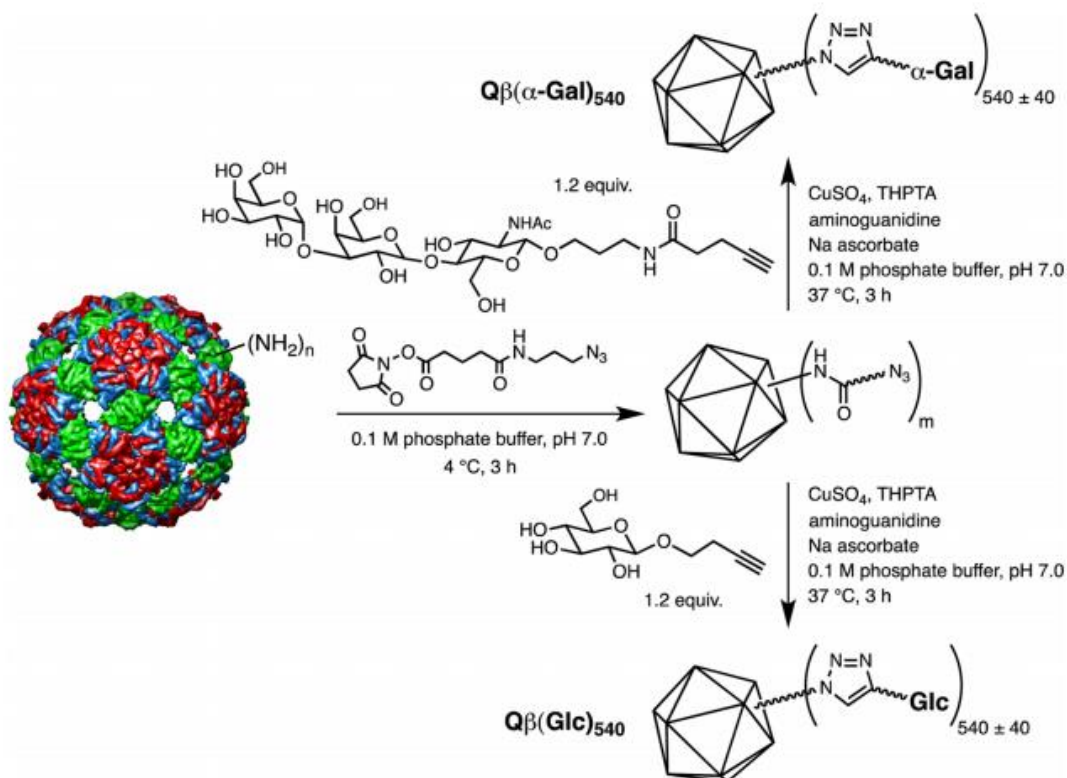
Diferentes isolados de *T. cruzi* gentilmente cedidos pelo Prof. Egler Chiari foram regularmente cultivados em laboratório. As cepas utilizadas neste projeto foram: Colombiana (TcI), Y (TcII) e CL-Brener (TcVI).

Camundongos Swiss provenientes do Biotério Central/UFMG foram infectados com formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Colombiana; Y, ou clone CL-Brener. Os parasitos foram mantidos por sucessivas passagens via intraperitoneal de tripomastigotas sanguíneos. As passagens dos parasitos aconteceram de 14/14 dias para a cepa Colombiana e clone CL-Brener e de 7/7 dias para a cepa Y.

### **4.5 Preparo das Q $\beta$ virus-like particles (Q $\beta$ -VLP)**

Virus-like particles (VLP) são conjuntos de proteínas de capsídeos não infecciosas que não possuem o genoma do vírus a partir do qual são adaptadas. O vírus bacteriófago Q $\beta$  foi utilizado como modelo para a síntese da Q $\beta$ -VLP. Foram isoladas aproximadamente 150 mg de partículas purificadas por litro de cultura, apresentando uma estrutura icosaédrica a partir do sistema de expressão em *E. Coli* do revestimento truncado de 132 aminoácidos da proteína. As partículas funcionalizadas foram preparadas como mostrado na **Figura 13** e como descrito previamente (FIEDLER *et al.*, 2010), envolvendo a instalação de um ligante curto terminado

em azida na superfície do capsídeo, seguido por uma cicloadição azida/alcino catalisada por cobre conectada a um derivado  $\alpha$ Gal-alcino (HONG *et al.*, 2009).



**Figura 13 - Síntese de virus-like particle (VLP)  $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$ . Resumo das etapas realizadas para ligar covalentemente o trissacarídeo  $\alpha\text{-Gal}$  [ $\text{Gal}\alpha(1,3)\text{Gal}\beta(1,4)\text{GlcNAc}$ ] à VLP por ligação azida/alcino. A imagem na esquerda é uma representação da estrutura cristalina por raios-X da partícula  $Q\beta$ . (BRITO *et al.*, 2016)**

Foram produzidos dois lotes da partícula, o primeiro com uma média de 180 unidades do carboidrato  $\alpha\text{-Gal}$  e o segundo com 540 por partícula. De acordo com a análise por espectrometria de massa, e a estrutura do capsídeo, a partícula permanece intacta e altamente estável para armazenamento em longo prazo. Interessante observar que a cadeia terminada em alcino no  $\alpha\text{Gal}$ -alcino está ligada através de uma ligação  $\beta$  ao resíduo  $\text{GalNAc}$ , enquanto que em tGPI-mucinas uma ligação  $\alpha$  é feita a partir de  $\text{GalNAc}$  para o resíduo treonina. Foram produzidas também partículas  $Q\beta$ -VLP contendo o carboidrato Rham,  $\alpha\text{-Gal}$  e Rham e glucose. A glucose foi escolhida para mimetizar a partícula coberta, mas apresentando um açúcar comum ao organismo, ou seja, menos imunogênico. Foram utilizadas também partículas  $Q\beta$  não cobertas, para análise do adjuvante puro

Estas partículas foram produzidas por MG Finn no Instituto de Química e Bioquímica GeorgiaTech, localizada em Atlanta, Estados Unidos.

#### 4.6 Imunização dos animais

As imunizações ocorreram de formas diferentes em dois momentos:

➤ Para confirmar a imunogenicidade da vacina de Q $\beta$ - $\alpha$ Gal, foi realizado um experimento prévio contendo grupos de cinco camundongos isogênicos C57BL/6 fêmeas e deficientes para a enzima  $\alpha$ 1,3GT, com idade entre 6-8 semanas. Cada animal recebeu três doses contendo 10 $\mu$ g da partícula Q $\beta$ - $\alpha$ Gal em 200 $\mu$ L de PBS/dose/imunização, sendo cada uma com intervalo de 1 semana. A partícula Q $\beta$  utilizada apresentou cerca de 180 moléculas de  $\alpha$ -Gal [Q $\beta$ ( $\alpha$ -Gal)<sub>180</sub>]. As imunizações foram feitas por via intraperitoneal. Como controles, cinco animais receberam as mesmas três doses contendo 10 $\mu$ g da partícula Q $\beta$  (ou Q $\beta$ -Glu) em 200 $\mu$ L de PBS/dose/imunização. A produção de anticorpos anti- $\alpha$ Gal foi verificada em camundongos infectados e não infectados em diversos momentos.

➤ Para avaliar a eficácia das vacinas de carboidratos, foram criados grupos de três camundongos isogênicos C57BL/6 fêmeas e deficientes para a enzima  $\alpha$ 1,3GT, com idade entre 6-8 semanas. Cada animal recebeu quatro doses contendo 5 $\mu$ g das partículas Q $\beta$ - $\alpha$ Gal, Q $\beta$ -Rham, Q $\beta$ - $\alpha$ Gal/Rham e Q $\beta$ -Glu, em 200 $\mu$ L de tampão carbonato-bicarbonato/dose/imunização, sendo cada uma com intervalo de uma semana. A partícula Q $\beta$  utilizada apresentou cerca de 540 moléculas de  $\alpha$ -Gal [Q $\beta$ ( $\alpha$ -Gal)<sub>540</sub>]. As imunizações foram feitas por via intraperitoneal, com o auxílio de uma seringa de insulina. A produção de anticorpos foi verificada em todos os camundongos antes e após a imunização e ao fim do experimento.

#### 4.7 Inoculação dos animais

As infecções ocorreram uma semana após as imunizações, portanto, também seguiram diferentes protocolos na confirmação da imunogenicidade e na eficácia das vacinas de carboidratos:

➤ Na confirmação da imunogenicidade da vacina de Q $\beta$ - $\alpha$ Gal, camundongos  $\alpha$ 1,3GT-WT e  $\alpha$ 1,3GT-KO foram infectados intraperitonealmente com 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> ou 10<sup>6</sup> tripomastigotas sanguíneos da cepa Y ou Colombiana provenientes de camundogos. Os grupos controles foram inoculados intraperitonealmente com PBS. Os animais foram observados quanto à parasitemia, perda de peso e percentual de sobrevivência.

➤ Na avaliação da eficácia das vacinas de carboidratos, camundongos  $\alpha$ 1,3GT-KO foram infectados intraperitonealmente com 10<sup>2</sup> ou 10<sup>3</sup> formas tripomastigotas (ft) do clone CL-Brener e cepa Colombiana respectivamente. Os animais foram distribuídos em quatro grupos pré-imunizados contendo três animais avaliados, sendo eles: Q $\beta$ - $\alpha$ Gal, Q $\beta$ -Rham, Q $\beta$ -

$\alpha$ Gal/Rham e Q $\beta$ -Glu. Os animais foram observados quanto à parasitemia, perda de peso e percentual de sobrevivência.

#### **4.8 Parasitemia e taxa de sobrevivência**

Os camundongos foram colocados numa caixa de retenção, de modo que somente a cauda ficasse exposta. Foi retirado sangue da cauda do camundongo através de um pequeno corte da mesma, e a contagem dos parasitos foi feita pelo método descrito por BRENER (1962), que consiste em colocar uma alíquota de 5 $\mu$ L de sangue infectado em uma lâmina de microscópio cobrindo-a com uma lamínula 22X22mm, esta amostra foi analisada no microscópio óptico sob a objetiva de 40x, determinando assim o número de parasitos em 50 campos distribuídos aleatoriamente em toda área da lamínula. O fator de correção foi calculado para cada microscópio utilizado. Os dados foram plotados como quantidade de tripomastigotas por mL de sangue. A contagem das formas sanguíneas do *T. cruzi* ocorreu em todos os animais de acordo com a cepa de infecção:

*Y*: diariamente do 5<sup>o</sup> ao 20/22<sup>o</sup> dia ou até a morte, o que correu antes.

*Clone CL-Brener*: 2x2 dias, do 8<sup>o</sup> ao 30<sup>o</sup> dia ou até a morte, o que correu antes.

*Colombiana*: 4x4 dias, do 12<sup>o</sup> ao 60<sup>o</sup> dia ou até a morte, o que correu antes.

A mortalidade dos animais foi monitorada diariamente e plotada como percentual de sobrevivência.

#### **4.9 Acompanhamento do peso**

Os camundongos foram pesados antes do desafio com tripomastigotas de *T. cruzi*. Após a infecção, a aferição ocorreu nos mesmos dias da parasitemia e semanalmente após o tempo de parasitemia. Todos os animais foram pesados individualmente.

#### **4.10 Necrópsia e análise semi-quantitativa das lesões cardíacas nos camundongos C57BL/6 ( $\alpha$ 1,3GT-KO) infectados**

Os animais foram sacrificados por hipovolemia sob anestesia geral e deslocamento cervical. O sangue foi centrifugado à 2500 rpm por 10 min e o soro recolhido para dosagem de anticorpos anti- $\alpha$ Gal. Além do sangue, foi retirado também o coração, que foi dividido em duas partes iguais, a primeira conservada em etanol a 100% para realizar a extração de DNA e a segunda foi fixada em formol tamponado 10% pH 7,2 para análise histológica.

Após a eutanásia, parte do coração foi removida e lavada em água destilada. Os corações foram fixados em solução formol a 10% em PBS, desidratados em soluções de álcoois etílicos em concentrações crescente (70%, 80%, 90%, 95% e 100%), diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em 4 $\mu$ m, corados pela Hematoxilina e Eosina (H&E) e Tricrômico de Gomori. Ao final, as lâminas foram montadas com lamínulas e Etellan e submetidos à análise histopatológica e semi-quantitativa em microscopia óptica. As lesões exibidas no miocárdio foram descritas quanto a intensidade da inflamação e topografia.

Para análise semi-quantitativa as lâminas foram examinadas em microscópio óptico de campo claro acoplado a um sistema de captura digital de Imagem (Motic 2.0). Para o escore da inflamação do miocárdio foram capturadas 10 imagens aleatórios por animal com aumento de 20X. O score foi baseado em 4 graus para inflamação do miocárdio sendo: grau 0 ausência de células inflamatórias em torno dos cardiomiócitos (ausente); grau 1 alguns cardiomiócitos possuíam um pequeno número de células inflamatórias (discreto); grau 2 alguns cardiomiócitos possuíam em torno inflamação significativa (moderado); grau 3 alguns cardiomiócitos possuíam intenso infiltrado inflamatório (aumentado). A análise histopatológica de score seguiu os mesmos critérios de MARTINS *et al.*, 2003.

#### **4.11 Extração de DNA do coração, de camundongos C57BL/6 ( $\alpha$ 1,3GT-KO) infectados com a cepa Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi***

Parte do coração dos camundongos infectados com *T. cruzi* foi coletado e conservado em etanol a 100% para realizar a extração de DNA pelo método fenolclorofórmio, utilizando 25 mg de tecido infectado. O tecido foi lavado rapidamente com 600 $\mu$ L de tampão TE (Tris-EDTA) e centrifugado a 21000g por 2 min. O tecido foi submetido a trituração e em seguida foi adicionado 500  $\mu$ l de Tampão de Lise TNES (10 mM Tris HCl pH 8, 200mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% SDS) com 20 $\mu$ l de proteinase K numa concentração de 20mg/ml (Invitrogen). Posteriormente, o tecido cardíaco foi incubado a 56°C por 16h, após este tempo de incubação foi adicionado 750 $\mu$ l de Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamílico (25:24:1), homogeneizado e centrifugado a 16000 g por 5 min. A fase transparente (sobrenadante) obtido após a centrifugação foi coletado e adicionado a 700 $\mu$ l de Clorofórmio: Isoamílico (24:1), homogeneizado e centrifugado a 16000 g por 5 min. Este novo sobrenadante foi adicionado com 30 $\mu$ l de acetato de sódio e 1 ml de etanol absoluto para obter o DNA. Finalmente este sobrenadante com o DNA foi centrifugado a 16.000g por 30 min e o sedimento obtido foi lavado com 1ml de etanol a 70%, centrifugado a 16.000 g por 5 min e secado à temperatura

ambiente. O DNA do tecido cardíaco foi ressuspensionado em 100 µl de *Buffer* AE (Kit comercial Qiagen) e armazenado a -20°C até serem utilizados para as reações de PCR em tempo real.

#### **4.12 Avaliação da carga parasitária tecidual cardíaca de camundongos C57BL/6 ( $\alpha$ 1,3GT-KO) infectados com a cepa Colombiana ou clone CL Brener de *T. cruzi***

A carga parasitária em tecidos de camundongos C57BL/6 infectados com diferentes cepas de *T. cruzi* avaliadas neste estudo foi determinada mediante quantificação absoluta por PCR em tempo real. A qPCR quantitativa em tempo real foi realizada com base em métodos previamente publicados por Piron *et al.* (2007), com algumas modificações. Resumidamente, o DNA foi extraído seguindo um protocolo de fenol-clorofórmio. Os iniciadores cruzi1: 5'-ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA-3' e cruzi2: 5'-AATTCCTCCAAGCAGCGGATA-3' e a sonda cruzi 3: 5'-CACACACTGGACACCAA-3' marcada em 5' com FAM (6-carboxifluoresceína) e em 3' com MGB (ligante de sulco menor), foram utilizados para amplificar um fragmento de DNA de 166 pares de bases da região satélite do gDNA de *T. cruzi*. As reações para o PCR em tempo real foram preparadas contendo: 10µL de 2X Master Mix com uracil-n-glicosilase (Applied Biosystems), 1µmol/L de cada iniciador, 0,2 µmol/L da sonda cruzi 3 e 100ng do DNA genômico do tecido cardíaco. As condições de amplificação foram realizadas nas seguintes etapas: 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, seguido por 40 ciclos de amplificação a 95°C durante 15 seg, 58°C durante 1 min e 72°C durante 1 min. As variações na intensidade da fluorescência se mediram no canal F1 do instrumento *StepOne Plus Real Time 7700*, no final da fase de extensão de cada ciclo. O ciclo de *threshold* foi determinado pela curva padrão desenhada de acordo com a cepa de *T. cruzi* caracterizadas previamente como DTU TcI (cepa Colombiana) e DTU TcVI (clone CL Brener). Para o desenho da curva padrão, foram inoculadas 10<sup>5</sup> formas epimastigotas da respectiva cepa/clone de *T. cruzi*, em 25mg de tecido de camundongo não infectado (controle negativo). Em seguida foi realizada a extração de DNA pelo método fenol - clorofórmio. Uma vez obtido este DNA foi diluído sucessivamente 1:10, a partir de 10<sup>5</sup> equivalente-parasito (Eq-P)/mg até 100 Eq-P/mg. As diluições foram feitas com DNA de tecido não infectado numa concentração de 50ng/µl. Resumindo, esta quantificação determina o número de equivalente parasito por miligrama de tecido utilizado para a extração do DNA (Nº Eq-P/mg) em relação a uma curva padrão desenhada a partir do DNA obtido de uma quantidade de parasitos (2,5x10<sup>5</sup>) junto com uma quantidade exata de tecido (25mg) sequencialmente diluída (1:10) até a quantidade mínima (1x10<sup>0</sup>) detectada. Assim, o Nº Eq-P/mg foi determinado considerando o ciclo de amplificação, ou seja, quanto maior o número de ciclos, menor o Eq-P/mg e vice-versa.

#### 4.13 Remoção do epítipo $\alpha$ Gal

Para verificar a especificidade da ligação foi realizado o tratamento do antígeno pela enzima  $\alpha$ -galactosidase - *Green coffee beans* (Sigma Aldrich) e adicionados 10U/mL da enzima (50 $\mu$ L por well) e incubados a 28 °C por 10h. Após a incubação, as placas foram lavadas cinco vezes com solução (PBS 1X, pH 7, 4 e 0,05 % de Tween 20), e os demais passos do ELISA foram realizados conforme protocolo descrito no item seguinte,

#### 4.14 Resposta imune humoral – Anticorpos Líticos Anti- $\alpha$ Gal

Inicialmente, as partículas semelhantes a vírus Q $\beta$ ( $\alpha$ -Gal)<sub>180</sub> ou Q $\beta$ ( $\alpha$ -Gal)<sub>540</sub> (50 $\mu$ L, 0,2 $\mu$ g/ $\mu$ L em tampão carbonato/bicarbonato 50mM pH 9,5) foram imobilizadas em uma placa de ELISA de 96 poços (Nunc). Após incubação overnight a 4°C, sítios livres de ligação foram bloqueados com albumina de soro bovino (BSA) 1% (Sigma, Aldrich) em tampão fosfato-salino (PBS), pH 7,4. As placas foram incubadas com 50 $\mu$ L de soro murino, numa diluição de 1:100 (ou 1:100 - 1:800) em PBS contendo 1% de BSA (PBS/BSA 1%). As placas foram então sequencialmente incubadas com 50 $\mu$ L de anticorpo anti-IgG murino (diluição de 1:2000) (Amersham, GE Healthcare Life Sciences, UK) em PBS/BSA 1%, e 50 $\mu$ L de estreptavidina conjugada com a enzima horseradish peroxidase (HRP) (diluição 1:1500) (Amersham, GE Healthcare Life Sciences, UK) em PBS/BSA 1%. Todas as etapas foram realizadas a 37°C por 1 h. As placas foram lavadas três vezes com tampão carbonato-bicarbonato contendo 0,05% de Tween 20 após cada período de incubação. A reação foi desenvolvida com 100 $\mu$ L de substrato para peroxidase SigmaFast® OPD (o-fenilenodiamina) (Sigma-Aldrich) e a reação foi parada pela adição de ácido sulfúrico 4N. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro Multiskan GO (Thermo Scientific) em comprimento de onda de 492nm. Em cada placa foram incluídos um controle *background* (tampão de incubação sem soro adicionado), os quais, juntamente com as amostras, foram realizados em duplicata.

#### 4.15 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism 7* (GraphPad Inc., EUA). A distribuição normal dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov- Smirnov. Para análise entre dois grupos foram utilizados o teste T de Student para dados paramétricos e Mann-Whitney U para dados não paramétricos. Para análises de variâncias entre três ou mais grupos, com apenas uma variável qualitativa, foram realizados os testes One-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey. Todos os testes foram considerados significativos quando o valor de p foi igual ou inferior a 0,05.



## ***Resultados***

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação do perfil de resistência à infecção com cepas Y e Colombiana entre os animais selvagens e geneticamente deficientes para $\alpha$ -1,3-galactosiltransferase

O perfil de resistência em camundongos  $\alpha$ -GalT WT e  $\alpha$ -GalT KO foi avaliada após inoculação intraperitoneal de  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  formas tripomastigotas das cepas Y e Colombiana de *T. cruzi*. Quando infectados com a cepa Y, os animais  $\alpha$ -GalT KO inoculados com  $10^4$  ft (**Figura 14A**), apresentaram no pico de parasitemia cerca de 10% de tripomastigotas parasitos circulantes nos animais  $\alpha$ -GalT WT. A sobrevivência desses animais também chama a atenção com 33% de sobrevivência, além do maior tempo de sobrevivência dos animais que vieram à óbito. A mesma tendência de baixa parasitemia e maior tempo de sobrevivência foram encontrados na infecção com  $10^5$  (**Figura 14B**) e  $10^6$  (**Figura 14C**) ft (havendo, neste caso, uma diferença no tempo de sobrevivência) mas com uma alteração menor, tanto na quantidade de tripomastigotas encontrados no sangue no momento do pico, quanto no tempo de sobrevivência, sendo que com estes inóculos, todos os animais vieram a óbito. Outro dado interessante é que o dia do pico parasitêmico foi deslocado nas diferentes concentrações do inóculo, adiantando sua data quanto maior fosse o inóculo, como mostrado nas figuras **14A**, **14B** e **14C**.

A cepa Colombiana só foi capaz de levar à óbito os animais  $\alpha$ -GalT WT submetidos ao inóculo de  $10^6$  formas tripomastigotas, como mostrada na **Figura 15C**, quando 1/3 (33%) desses animais sucumbiram no 20º DPI, não havendo diferença entre as sobrevivências. O número de parasitos circulantes no sangue desses animais tende a ser maior em quase todas as infecções, independente do inóculo (**Figuras 15A, 15B e 15C**).

Assim sendo, podemos notar que os animais  $\alpha$ 1,3GT-KO demonstraram maior resistência à infecção, apresentando uma menor parasitemia e maior percentual de sobrevivência, independentemente da cepa ou inóculo. Além disso, os animais, em especial os  $\alpha$ 1,3GT-WT mostraram após o pico de parasitemia indícios de debilidade física como, perda de peso, letargia, pêlos eriçados e opacos, entre outros (dados não mostrados).

## Cepa Y

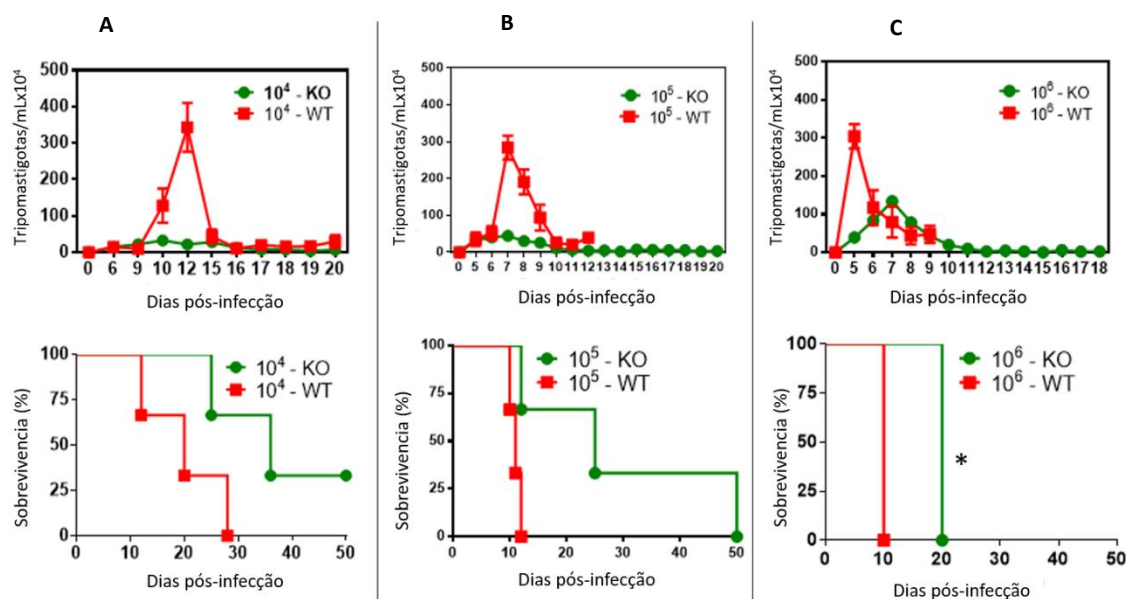


Figura 14 - Parasitemia e sobrevivência de camundongos  $\alpha$ 1,3GT-WT e  $\alpha$ 1,3GT-KO infectados com a cepa Y nas concentrações de  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  (14A, 14B e 14C respectivamente). n = 3. Considerado significativo (\*) o  $p < 0,05$ . DPI: Dias pós infecção

## Cepa Colombiana

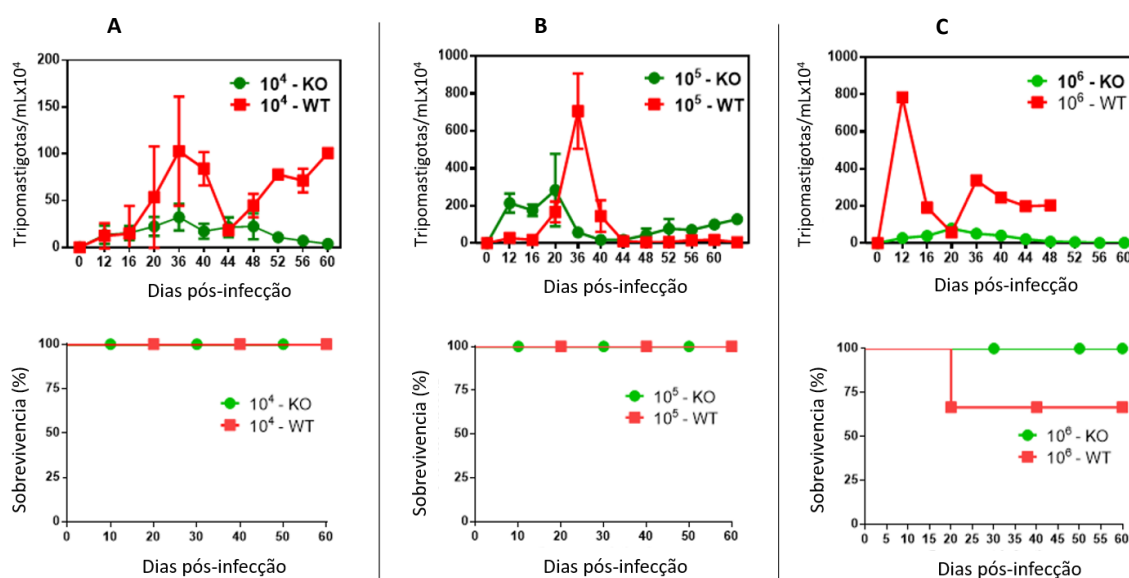
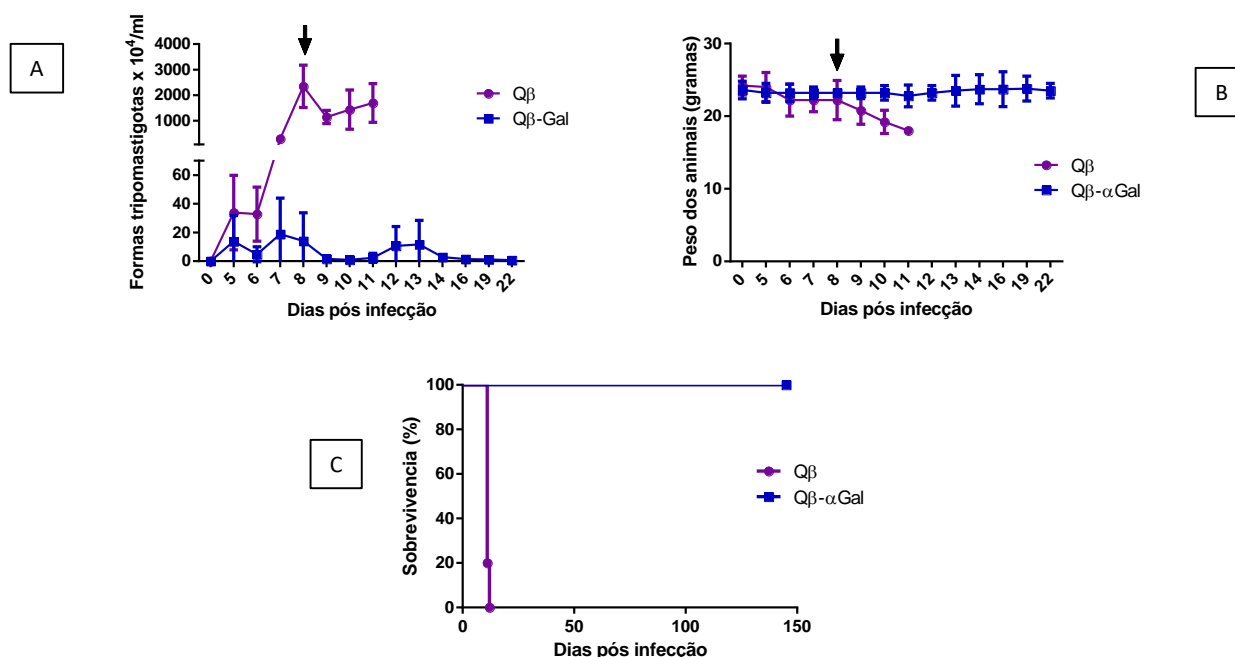


Figura 15 - Parasitemia e sobrevivência de camundongos  $\alpha$ 1,3GT-WT e  $\alpha$ 1,3GT-KO infectados com a cepa Colombiana nas concentrações de  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  (15A, 15B e 15C respectivamente). n = 3. Considerado significativo (\*) o  $p < 0,05$ . DPI: Dias pós infecção

## 5.2 Imunogenicidade da partícula Q $\beta$ VLP contendo 180 resíduos do carboidrato $\alpha$ Gal em animais geneticamente deficientes em $\alpha$ Gal

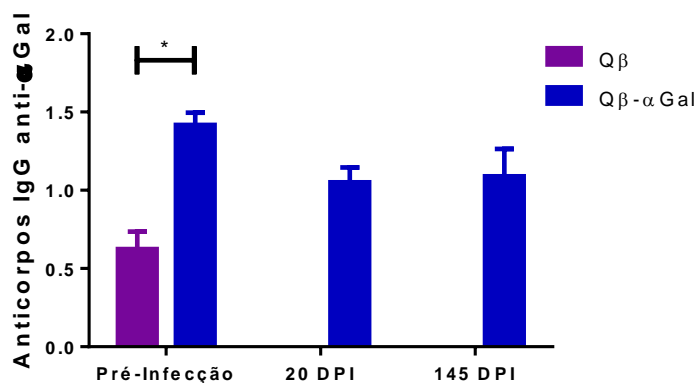
O desenvolvimento da infecção pelo *T. cruzi* foi avaliada em camundongos  $\alpha$ 1,3GT-KO após inoculação intraperitoneal de  $10^6$  formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y. A

parasitemia foi controlada nos animais imunizados, apresentando ao longo da infecção, uma quantidade muito menor de parasito circulante no sangue (**Figura 16A**). O pico de parasitemia ocorreu no 8º DPI e foi mais evidente no grupo imunizado com Q $\beta$  purificado (controle). Neste grupo, o pico de parasitemia coincidiu com o início da perda de peso corpóreo (**Figura 16B**) e, consequentemente esses animais vieram à óbito poucos dias depois (**Figura 16C**). Os animais imunizados com Q $\beta$ - $\alpha$ Gal demonstraram maior resistência à infecção, apresentando a manutenção do peso corporal e um percentual de sobrevivência de 100% ao longo dos 145 dias de experimento, ao passo que todo o grupo controle sucumbiu à infecção até o 11º dia de infecção (**Figura 16C**).



**Figura 16** – Acompanhamento da (A) parasitemia, (B) variação do peso e (C) sobrevivência dos animais  $\alpha$ 1,3GT-KO imunizados com Q $\beta$  contendo 180 partículas de  $\alpha$ Gal (Q $\beta$ - $\alpha$ Gal) ou não (Q $\beta$ ). n = 5.

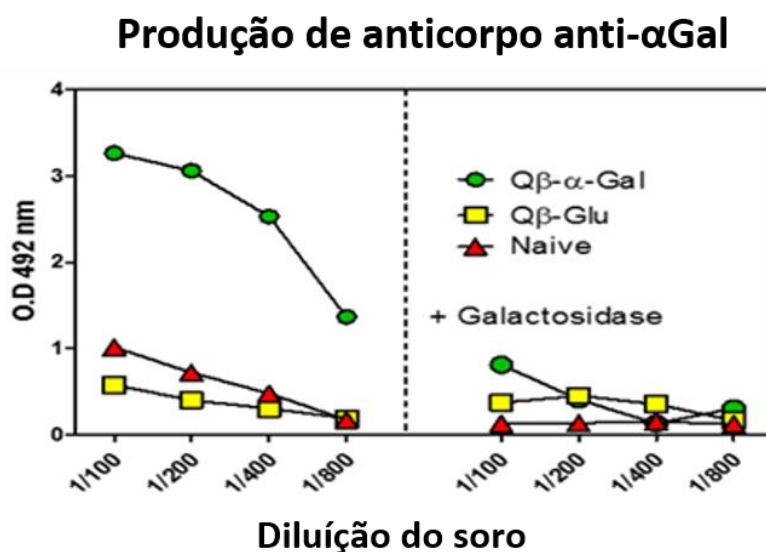
O soro dos animais imunizados foi coletado antes da infecção e dos animais infectados com 20 DPI e após a eutanásia (145 DPI). Os animais imunizados com Q $\beta$ - $\alpha$ Gal produziram títulos de anticorpos anti- $\alpha$ Gal cerca de duas a três vezes mais elevados do que os animais que receberam o Q $\beta$  puro. Esses altos níveis de anticorpos anti- $\alpha$ Gal se mantiveram ao longo de todo o experimento, não apresentando diferenças entre 20 DPI e 145 DPI (**Figura 17**).



**Figura 17 - Produção de anticorpos anti- $\alpha$ Gal séricos em animais  $\alpha$ 1,3GT-KO imunizados (Q $\beta$ - $\alpha$ Gal) ou não (Q $\beta$ ). n = 5. DPI: Dias pós infecção; Considerado significativo (\*) p < 0,01**

### 5.3 Confirmação da especificidade do anticorpo IgG anti- $\alpha$ Gal

A produção de anticorpos anti- $\alpha$ Gal específicos foi verificada no soro de animais imunizados com Q $\beta$ - $\alpha$ Gal e controles que receberam Q $\beta$ -Glu ou PBS (*naive*). Os animais imunizados apresentaram maior quantidade de anticorpos IgG anti- $\alpha$ Gal que os animais não imunizados. Para confirmar se a especificidade deste anticorpo é realmente contra o  $\alpha$ Gal e não contra o Q $\beta$ , o antígeno foi tratado com a enzima  $\alpha$ Galactosidase que remove o epítipo  $\alpha$ Gal. Após este tratamento é possível afirmar que estes anticorpos são específicos para o epítipo  $\alpha$ Gal, uma vez que houve uma redução da ligação antígeno-anticorpo, não havendo diferença entre os animais imunizados ou controles (**Figura 18**).

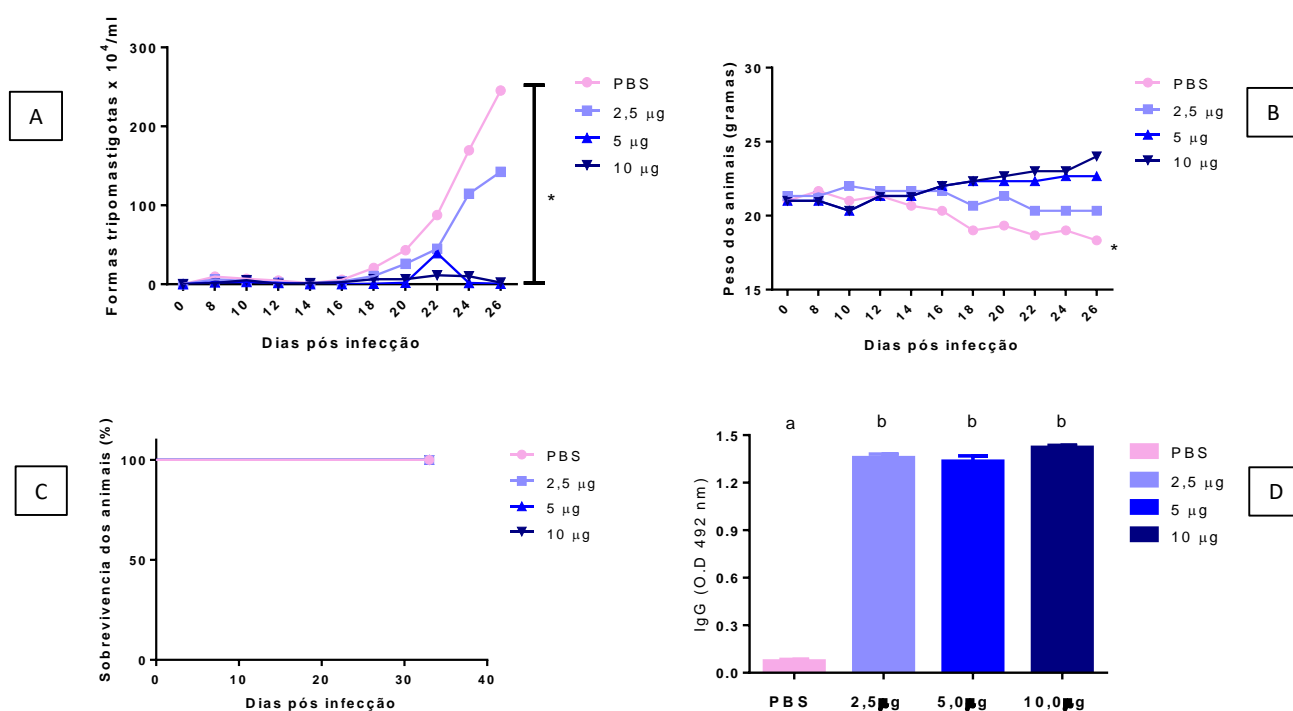


**Figura 18 – Reatividade do soro de animais  $\alpha$ 1,3GT-KO imunizados com Q $\beta$ - $\alpha$ Gal ou controles (Q $\beta$ -Glu ou PBS) antes e após o tratamento com a enzima  $\alpha$ -Galactosidase. n = 3. Naive: tratado i.p. com PBS**

## 5.4 Definição da dose vacinal a ser administrada

Para determinar o modelo de imunização a ser adotado foi feito um teste com diferentes doses do antígeno Q $\beta$ - $\alpha$ Gal. Três animais  $\alpha$ 1,3GT-KO foram imunizados, ou não, com doses de 2,5 $\mu$ g, 5,0 $\mu$ g e 10,0 $\mu$ g/200 $\mu$ L/dose. O grupo controle recebeu doses de 200 $\mu$ L de PBS intraperitonealmente. Os animais tiveram sua parasitemia, peso e sobrevivência acompanhados, e no momento da eutanásia, foram coletados soro e coração para análises da carga parasitária no tecido cardíaco e histologia semi-quantitativa para inflamação e presença de ninhos de amastigotas.

Os animais foram sacrificados com apenas 33 DPI, tempo ainda não suficiente para levar à mortalidade (**Figura 19C**), mas já possível de ver os danos causados no animal. Como visto no gráfico da **figura 19A**, os animais controle apresentaram uma parasitemia maior que os animais imunizados com 5  $\mu$ g de Q $\beta$ - $\alpha$ Gal, enquanto a perda de peso dos animais não imunizados se mostrou mais acentuada quando comparada ao restante dos animais imunizados (**Figura 19B**). As imunizações foram capazes de proporcionar aumento dos níveis de anticorpos anti- $\alpha$ Gal, não apresentando diferença nas respostas às imunizações (**Figura 19D**)



**Figura 19** – Acompanhamento da (A) curvas de parasitemia, (B) variação do peso corporal, (C) sobrevivência e (D) detecção de IgG anti-  $\alpha$ Gal por ELISA nos soros dos camundongos C57BL/6  $\alpha$ 1,3GT-KO imunizados ou não, e infectados com 10<sup>4</sup> formas tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. n= 3. Os dados acima foram analisados como média +/- SEM e analisados por One Way ANOVA (teste Bonferroni) e teste t student, sendo considerado significativo (\* ou letras diferentes) o p<0,05.

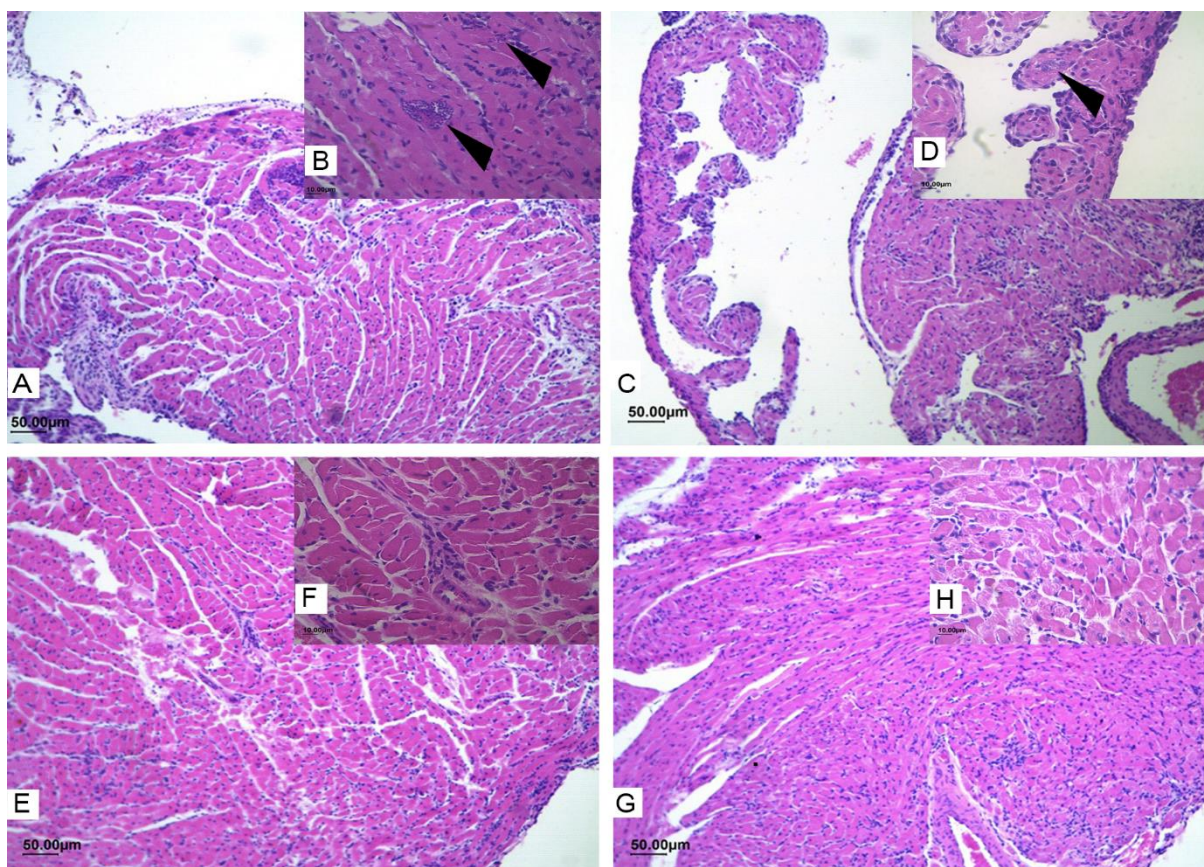


A análise semi-quantitativa dos tecidos mostrou uma diferença entre os animais que não receberam o antígeno Q $\beta$ - $\alpha$ Gal, os que receberam a dose de 2,5 $\mu$ g/dose e as demais imunizações com relação aos ninhos de amastigotas de *T. cruzi*. Em todos os animais foram encontradas uma inflamação moderada, como visto na **Tabela 1**.

**Tabela 1 - Análise histológica dos animais  $\alpha$ 1,3GT-KO imunizados com diferentes doses de Q $\beta$ - $\alpha$ Gal**

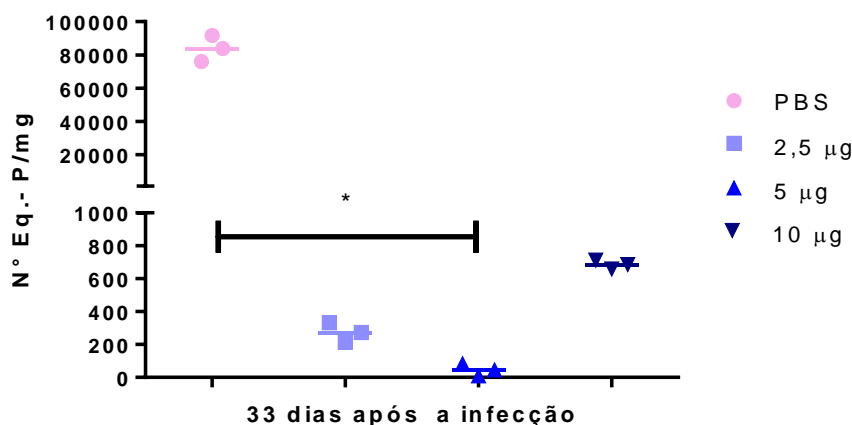
	Ninhos	Inflamação
Controle	+++	Moderada
2,5 $\mu$ g	+	Moderada
5,0 $\mu$ g	-	Moderada
10,0 $\mu$ g	-	Moderada

Dados ilustrados na **Figura 20**:



**Figura 20 - Fotomicrografia de corte histológico do coração de camundongos imunizados com diferentes doses e infectados com a cepa Y de *T. cruzi* e eutanasiados após 33 dias de infecção.** Todos os animais apresentaram inflamação moderada. A) Grupo controle (PBS) presença de muitos ninhos de amastigotas. B) 2,5  $\mu$ g de Q $\beta$ - $\alpha$ Gal: presença de poucos ninhos de amastigotas. C) 5  $\mu$ g de Q $\beta$ - $\alpha$ Gal: ausência de ninhos de amastigotas. D) 10  $\mu$ g de Q $\beta$ - $\alpha$ Gal: ausência de ninhos de amastigotas. n = 3. Coloração Hematoxilina e eosina. Ninhos de amastigotas (  $\blacktriangleright$  ) Foto em destaque: barra = 50  $\mu$ m; Foto em detalhe: barra = 10  $\mu$ m

Quando realizada a análise da carga parasitária por qPCR nós vimos que apenas o grupo que recebeu 5,0µg de Qβ-αGal mostrou-se diferente dos animais não imunizados (**Figura 21**).



**Figura 21** – Avaliação da carga parasitária cardíaca após imunizações com 2,5µg, 5µg e 10µg e PBS como controle. A carga parasitária foi determinada pela técnica de PCR quantitativa. n=3. Diferença considerada significativa entre os grupos controle (PBS) e 5µg (\*) quando  $p < 0,05$ .

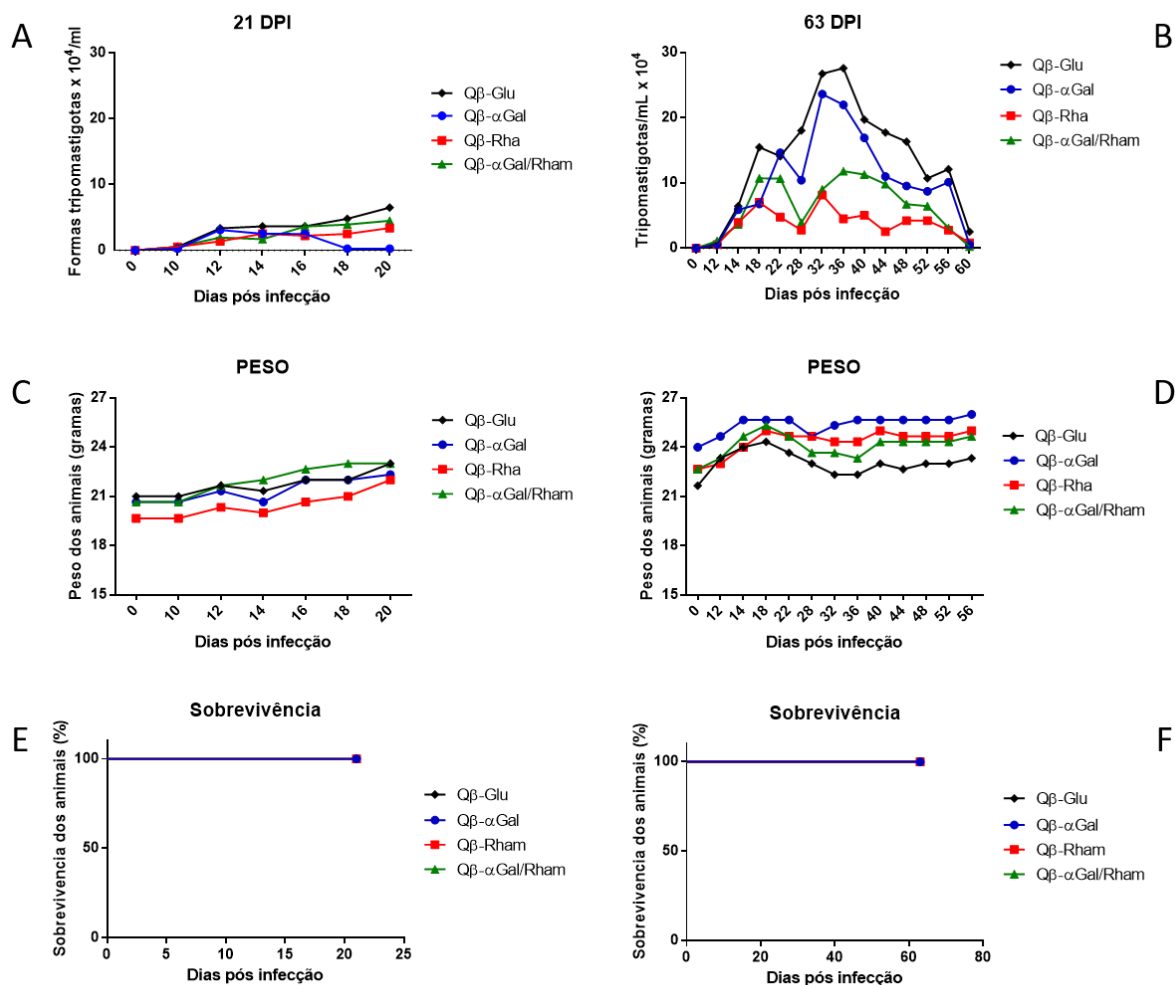
Com base nesses resultados, para garantir o sucesso da imunização, optou-se por imunizar os animais com 4 doses semanais de 5,0 µg de Qβ-αGal

### 5.5 Acompanhamento da infecção de animais $\alpha 1,3GT-KO$ com a cepa Colombiana e clone Cl-Brener de *T. cruzi*

O desenvolvimento da infecção pelo *T. cruzi* foi avaliado em dois momentos em camundongos  $\alpha 1,3GT-KO$  após inoculação intraperitoneal de  $10^3$  ft da cepa Colombiana ou  $10^2$  ft do clone Cl-Brener.

Podemos perceber que o inóculo utilizado para a infecção da cepa Colombiana não foi letal aos animais até o momento da necrópsia, mesmo os não imunizados sobreviveram à infecção (**Figuras 22E e 22F**). Assim como não houve diferença entre os grupos com relação à parasitemia (**Figuras 22A e 22B**). O peso corporal dos animais foi avaliado juntamente com a parasitemia, e semanalmente após essa fase. Verificamos também, que não houve diferença na variação no peso corporal dos animais infectados com a cepa Colombiana (**Figuras 22C e 22D**), independente do tempo de avaliação da infecção.

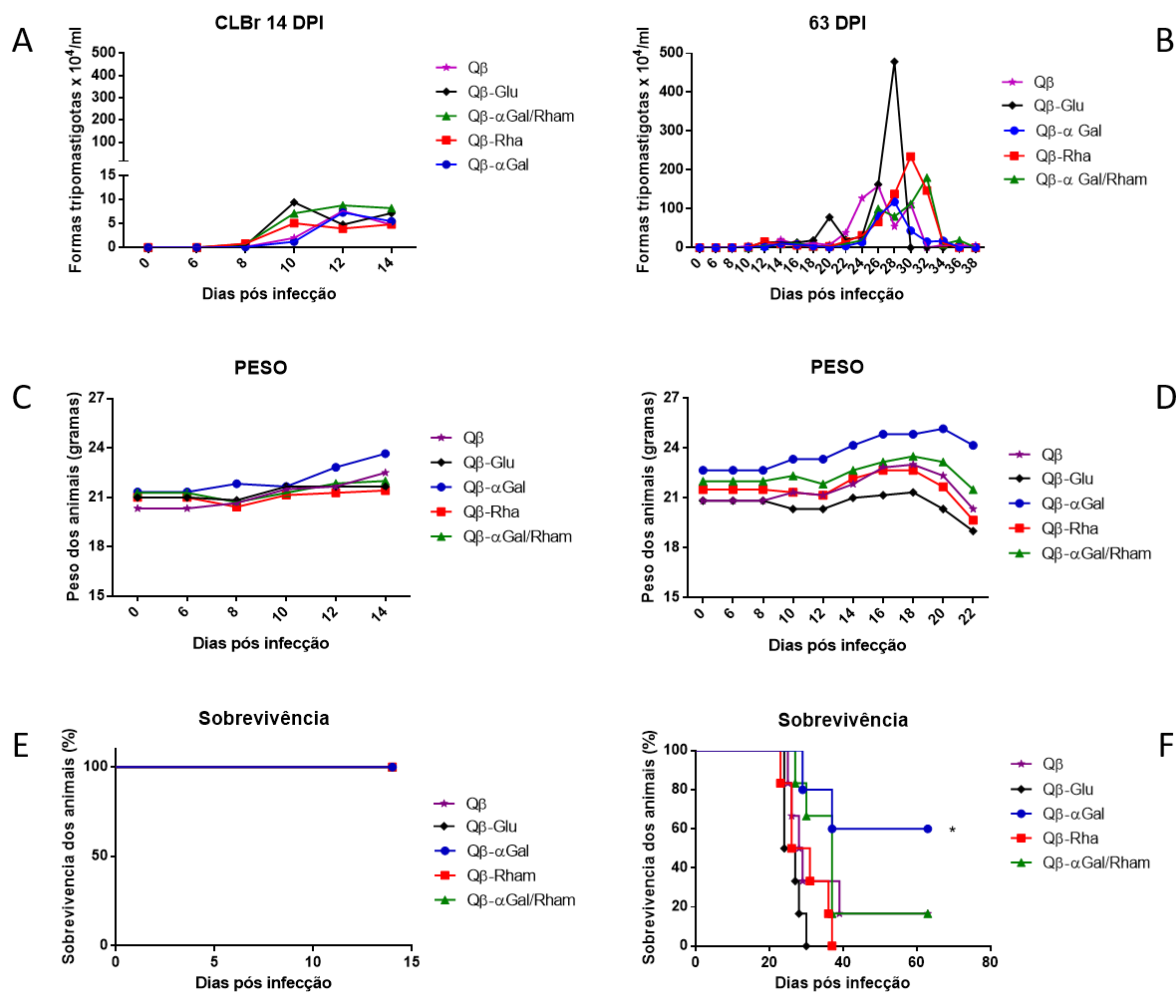




**Figura 22 - Acompanhamento das (A e B) curvas de parasitemia, (C e D) variação do peso corporal e (E e F) sobrevivência em camundongos C57BL/6  $\alpha$ 1,3GT-KO infectados com  $10^3$  formas tripomastigotas da cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*. Os resultados acima são referentes à experimentos de (A, C e E) 21 dias e (B, D e F) 63 dias de infecção. Os dados acima foram apresentados como média  $\pm$  SEM e analisados por One Way ANOVA (teste Bonferroni) e teste t student, sendo significativo (\*) o  $p < 0,05$ .  $n = 3$ . DPI: Dias pós infecção.**

No entanto, quando analisamos os animais infectados com  $10^2$  ft do clone CL-Brener podemos perceber que a partir do 18<sup>o</sup> DPI o peso corporal dos animais começaram a diminuir (**Figuras 23C e 23D**). Essa perda do peso corporal coincide com o início da debilidade na saúde desses animais (dados não mostrados) e culmina em sua morte, como podemos observar nas **Figuras 23E e 23F**, com exceção de 60% dos animais que foram imunizados com Qβ-αGal.

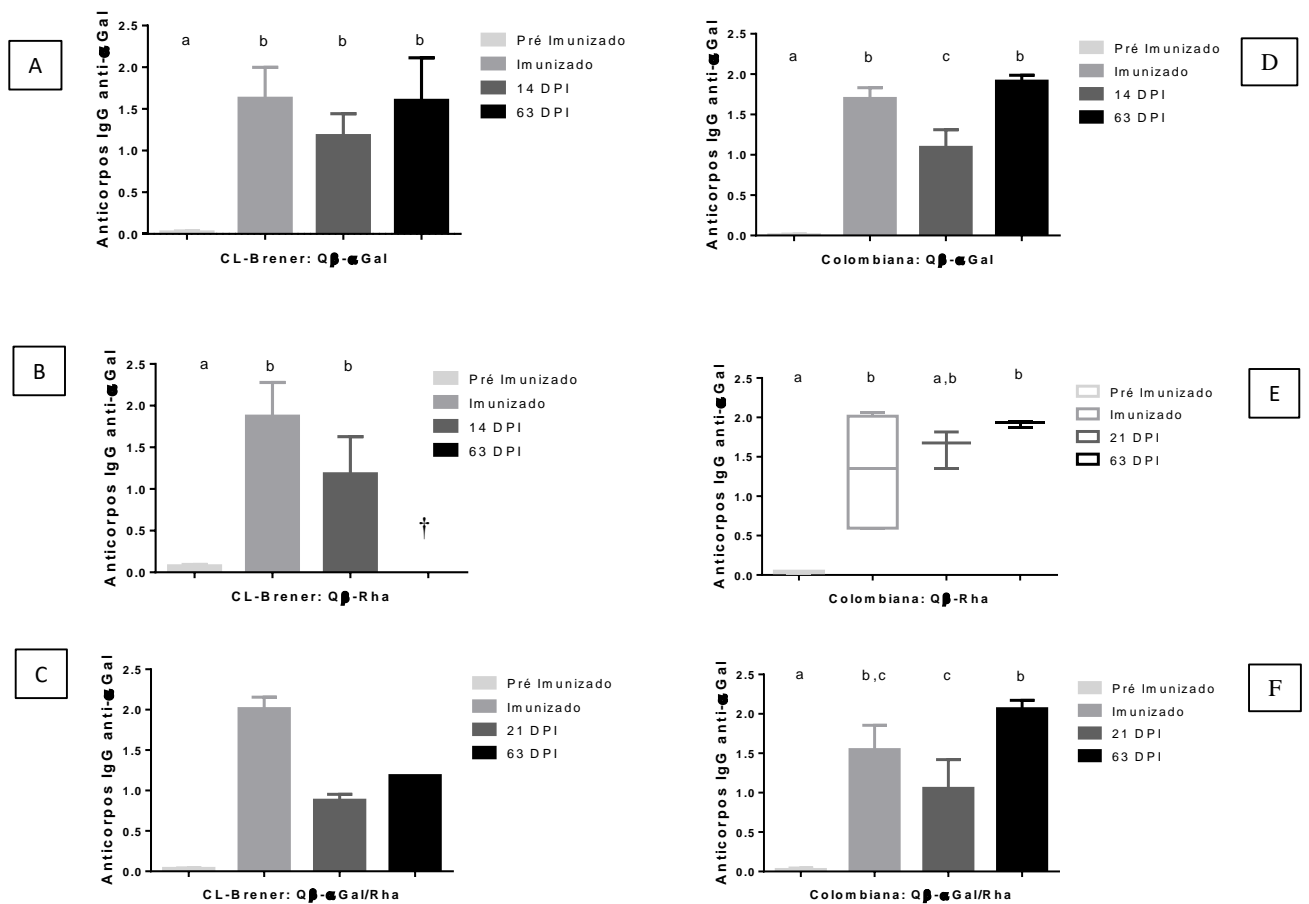
Além disso, podemos observar nos animais infectados com o clone Cl-Brener (**Figuras 23A e 23B**) uma parasitemia mais elevada que nos animais infectados com a cepa Colombiana (**Figuras 22A e 22B**).



**Figura 23** – Acompanhamento das (A e B) curvas de parasitemia, (C e D) variação do peso corporal e (E e F) sobrevivência em camundongos C57BL/6  $\alpha$ 1,3GT-KO infectados com  $10^2$  formas tripomastigotas do clone CL-Brener de *Trypanosoma cruzi*. Os resultados acima são referentes à experimentos de (A, C e E) 14 dias e (B, D e F) 63 dias de infecção. Os dados acima foram apresentados como média  $\pm$  SEM e analisados por One Way ANOVA (teste Bonferroni) e teste t student, sendo significativo (\*) o  $p < 0,05$ . n= 5. DPI: Dias pós infecção.

## 5.6 Verificação da produção de anticorpos em camundongos $\alpha$ 1,3GT-KO

Para confirmação da produção de anticorpos específicos foram realizados ensaios de ELISAs. Os soros dos animais foram coletados antes da imunização, após a imunização e no momento da necrópsia. Em seguida estes soros foram testados quanto a produção de anticorpos anti- $\alpha$ Gal, anti-Rham e anti- $\alpha$ Gal/Rham. Após a imunização, os animais foram capazes de produzir título de anticorpos mais elevados do que produziam antes da imunização. Este aumento do título de anticorpo se mantém ao longo de todo o experimento independentemente do antígeno vacinal (Figura 24A e D; B e E e C e F) e da cepa de infecção, mantendo a mesma tendência tanto no clone CL-Brener (Figura 24 A, B e C) quanto na cepa Colombiana (Figura 24 D, E e F).



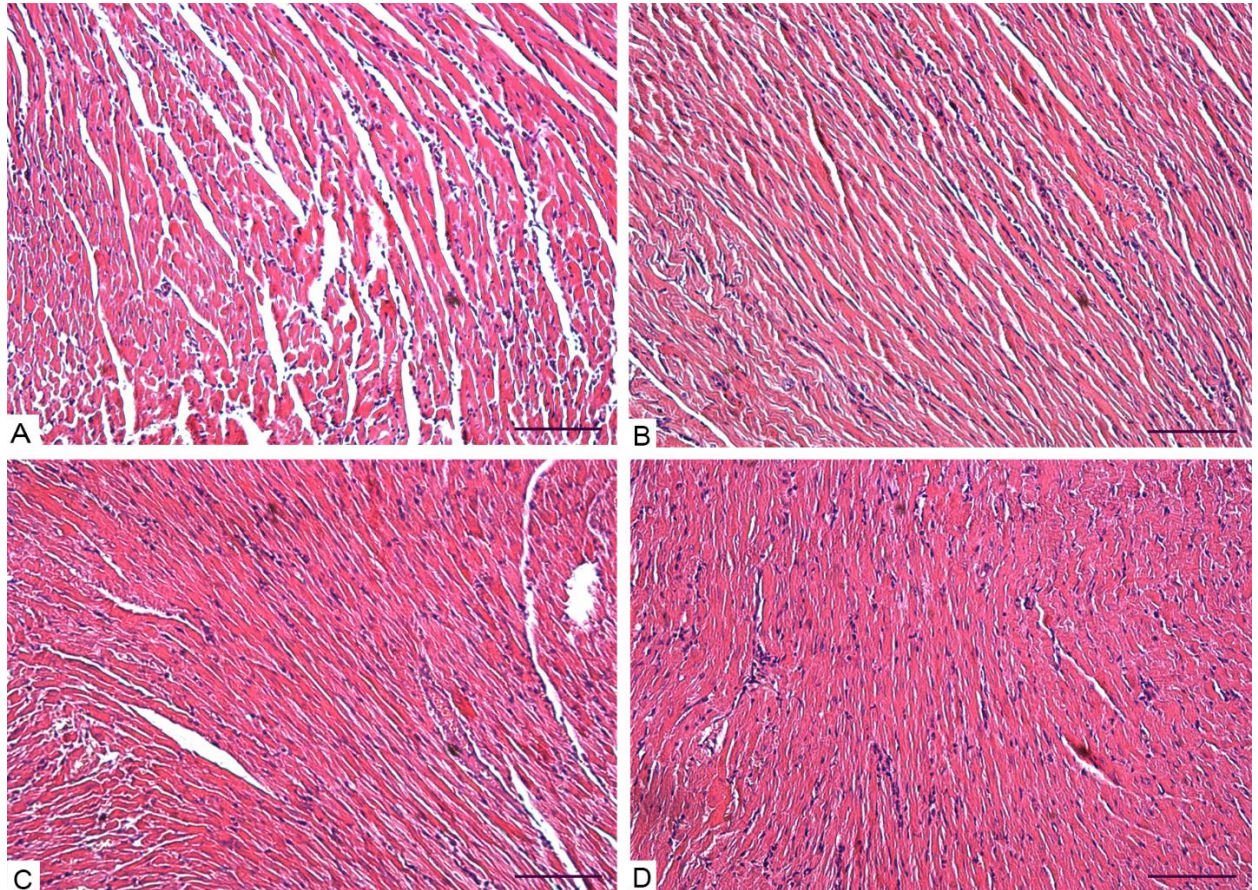
**Figura 24 - Detecção de IgG anti-antígeno por ELISA nos soros dos camundongos imunizados e infectados com o clone CL-Brener:** Produção de anticorpos pelos grupos imunizados com Q $\beta$ - $\alpha$ Gal (A), Q $\beta$ -Rham (B) e Q $\beta$ - $\alpha$ Gal/Rham (C). Letras diferentes mostram diferenças entre os grupos quando  $p < 0,05$ . † = animais não sobreviveram até 63 DPI.

### 5.7 Análise semi-quantitativa das lesões cardíacas nos camundongos C57BL/6 ( $\alpha$ 1,3GT-KO) infectados com a cepa Colombiana e o clone CL-Brener

A análise histopatológica do miocárdio dos camundongos pertencentes aos grupos Q $\beta$ -Glu, Q $\beta$ - $\alpha$ Gal, Q $\beta$ -Rham, Q $\beta$ - $\alpha$ Gal/Rham permitiu observarmos e descrevermos as lesões presentes no miocárdio ocasionadas pela infecção com a cepa Colombiana e clone CL Brener de *T. cruzi* quanto ao infiltrado inflamatório e topografia.

Quando realizada a análise histopatológica do miocárdio dos camundongos pertencentes ao grupos Q $\beta$ -Glu, Q $\beta$ - $\alpha$ Gal, Q $\beta$ -Rham e Q $\beta$ - $\alpha$ Gal/Rham infectados com a cepa Colombiana aos 21 DPI foi observado a presença de infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear caracterizado por linfócitos, e com intensidade de discreta a moderada, distribuído de forma difusa. Foi observado na maioria dos camundongos de ambos os grupos o predomínio de infiltrado inflamatório na região atrial (**Figura 25**).

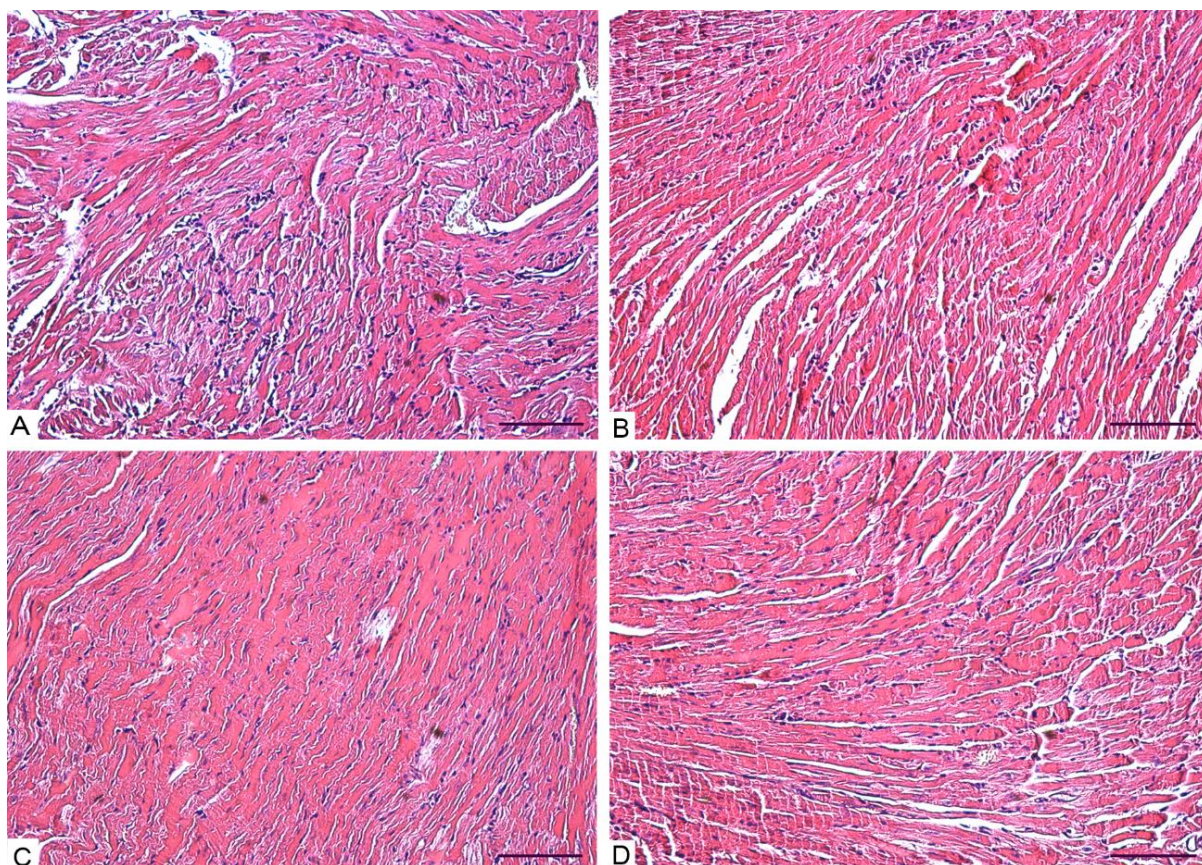




**Figura 25 -Fotomicrografia de corte histológico do coração de camundongos infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* e eutanasiados após 21 dias de infecção. A) Grupo Q $\beta$ -Glu: infiltrado inflamatório moderado no miocárdio. B) Q $\beta$ - $\alpha$ Gal: discreto infiltrado inflamatório no miocárdio. C) Q $\beta$ -Rham: Presença de infiltrado inflamatório moderado no miocárdio. D) Q $\beta$ - $\alpha$ Gal/Rham: infiltrado inflamatório moderado no miocárdio. n=3. Coloração Hematoxilina e eosina, barra = 50  $\mu$ m.**

Achados histopatológicos semelhantes foram observados no miocárdio dos camundongos pertencentes aos grupos Q $\beta$ -Glu, Q $\beta$ - $\alpha$ Gal, Q $\beta$ -Rham, Q $\beta$ - $\alpha$ Gal/Rham infectados com a cepa Colombiana e eutanasiados após 63 DPI (**Figura 26**).

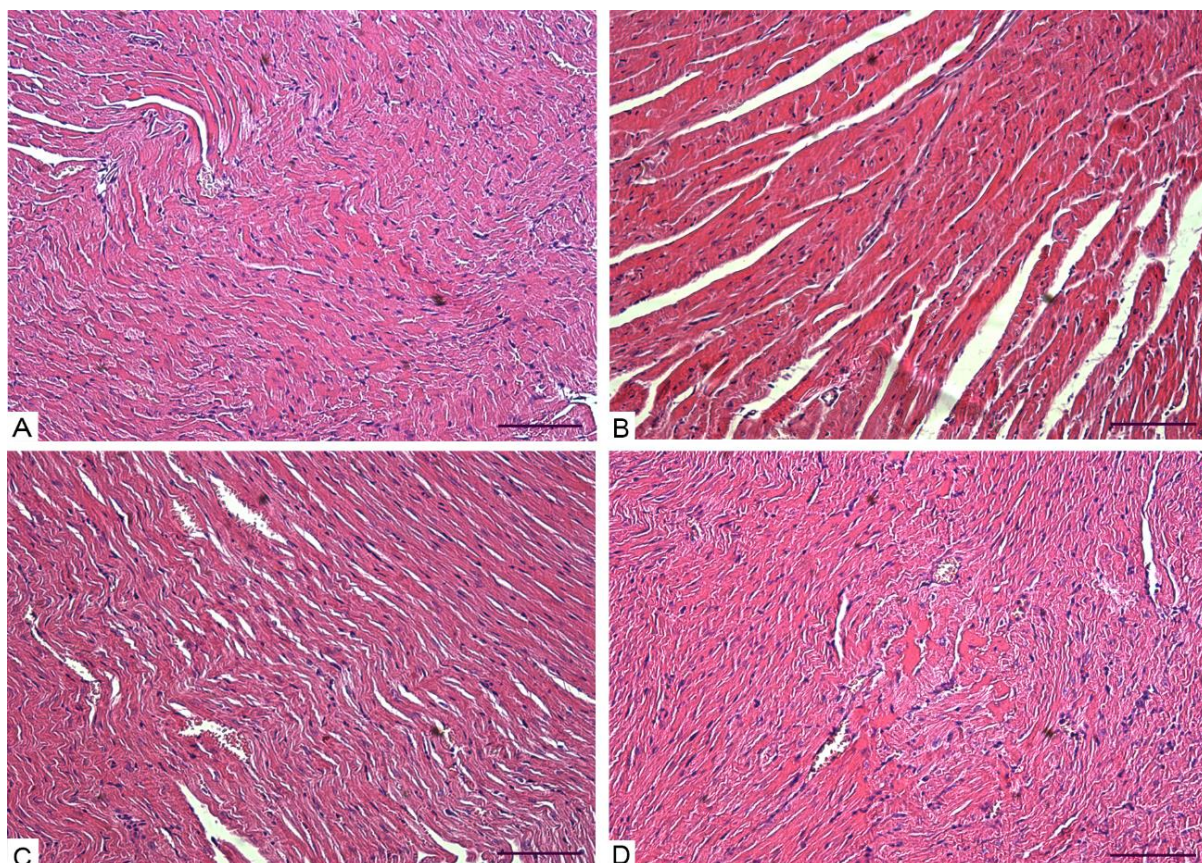




**Figura 26 - Fotomicrografia de corte histológico do coração de camundongos infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* e eutanasiados após 63 dias de infecção.** A) Grupo Q $\beta$ -Glu: presença moderada de infiltrado inflamatório. B) Q $\beta$ - $\alpha$ Gal: moderado infiltrado inflamatório no miocárdio. C) Q $\beta$ -Rham: presença de infiltrado inflamatório discreto no miocárdio. D) Q $\beta$ - $\alpha$ Gal/Rham: infiltrado inflamatório moderado no miocárdio. n= 3. Coloração Hematoxilina e eosina, barra = 50  $\mu$ m

Ao avaliarmos o miocárdio dos camundongos pertencentes aos grupos Q $\beta$ , Q $\beta$ -Glu, Q $\beta$ - $\alpha$ Gal, Q $\beta$ -Rham, Q $\beta$ - $\alpha$ Gal/Rham infectados com tripomastigotas do clone CL-Brener e eutanasiados após 14 DPI foi observado a presença de infiltrado inflamatório linfocitário com intensidade variando de discreta a moderada, distribuído de forma difusa (**Figura 27**).



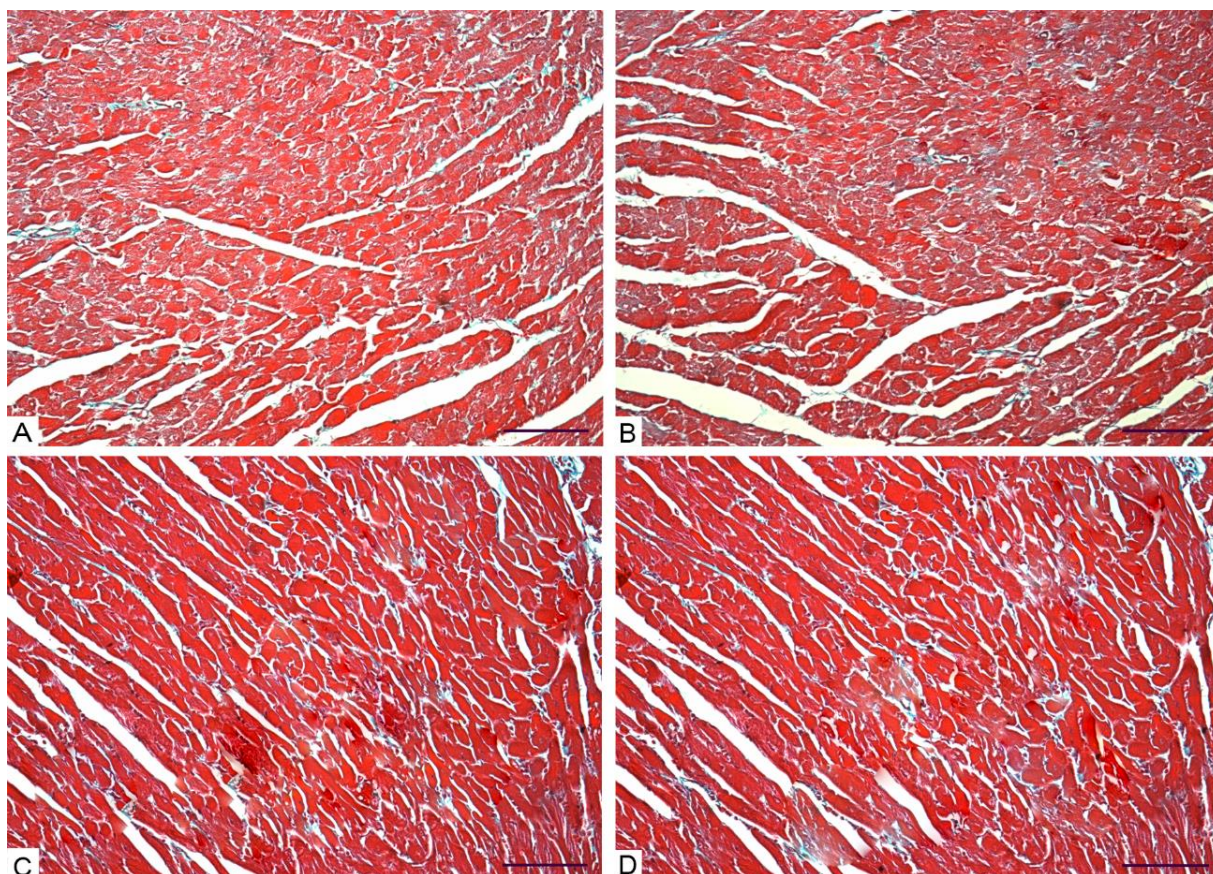


**Figura 27 - Fotomicrografia de corte histológico do coração de camundongos infectados com o clone CL-Brener de *T. cruzi* e eutanasiados após 14 dias de infecção. A) Grupo Q $\beta$ -Glu: presença discreta de infiltrado inflamatório. B) Q $\beta$ - $\alpha$ Gal: discreto infiltrado inflamatório no miocárdio. C) Q $\beta$ -Rham: presença moderada de infiltrado inflamatório no miocárdio. D) Q $\beta$ - $\alpha$ Gal/Rham: infiltrado inflamatório moderado no miocárdio. n = 5. Coloração Hematoxilina e eosina, barra = 50  $\mu$ m.**

A taxa de mortalidade foi alta nos camundongos infectados com o clone CL-Brener. Poucos camundongos sobreviveram até 63 dias após infecção. Os camundongos sobreviventes pertencentes aos grupos Q $\beta$ , Q $\beta$ - $\alpha$ Gal e Q $\beta$ - $\alpha$ Gal/Rham foram eutanasiados. Ao analisarmos o miocárdio desses camundongos, identificamos a presença de infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear caracterizado por linfócitos, distribuídos de forma difusa, com intensidade variando de discreta a moderada (dados não mostrados).

Quando analisadas as lâminas dos mesmos animais, mas com a coloração de Tricrômico de Gomori para a identificação de fibrose, vimos que nenhum animal, independente da cepa de infecção ou tempo de análise, desenvolveu fibrose no miocárdio no período estudado (**Figura 28**).





**Figura 28 - Fotomicrografia de corte histológico do coração de camundongos infectados identificando a ausência de fibrose em todos os grupos da cepa Colombiana e clone CL-Brener de *T. cruzi* nos dois momentos analisados.** Ausência de fibrose ilustrada por A) Colombiana imunizado com Q $\beta$ -Glu eutanasiado com 21 DPI. B) Colombiana imunizado com Q $\beta$ - $\alpha$ Gal eutanasiado com 63 DPI. C) CL-Brener imunizado com Q $\beta$ -Rham eutanasiado com 14 DPI. D) imunizado com Q $\beta$ - $\alpha$ Gal/Rham eutanasiado com 63 DPI. Coloração Tricrômico de Gomori, barra = 50  $\mu$ m.

Esses animais foram analisados também quanto a presença de ninhos de amastigotas e não foi encontrado ninhos em nenhum dos animais, independente da imunização, cepa ou tempo de infecção. Resumidamente, nenhum dos animais apresentaram ninhos de amastigotas ou fibrose, independentemente da cepa ou tempo de infecção e com relação a análise relacionada à inflamação (**Tabela 2**).

**Tabela 2 – Análise semi-quantitativa inflamatória histopatológica de cortes do miocárdio de camundongos dos grupos Q $\beta$ , Q $\beta$ -Glu, Q $\beta$ - $\alpha$ Gal, Q $\beta$ -Rham e Q $\beta$ - $\alpha$ Gal/Rham infectados com a cepa Colombiana ou clone CL-Brener nos tempos pesquisados. †: animais não sobreviveram à infecção; - grupos não realizados**

	<i>CL-Brener 14 DPI</i>	<i>CL-Brener 63 DPI</i>	<i>Colombiana 21 DPI</i>	<i>Colombiana 63 DPI</i>
<i>Q<math>\beta</math></i>	Moderado	Discreto	-	-
<i>Q<math>\beta</math>-Glu</i>	Discreto	†	Moderado	Moderado
<i>Q<math>\beta</math>-<math>\alpha</math>Gal</i>	Discreto	Discreto	Discreto	Moderado
<i>Q<math>\beta</math>-Rham</i>	Moderado	†	Moderado	Discreto
<i>Q<math>\beta</math>-<math>\alpha</math>Gal/Rham</i>	Moderado	Moderado	Moderado	Moderado

## *Discussão*



## 6 DISCUSSÃO

Por apresentar um ciclo de vida complexo, envolvendo fatores inerentes ao parasito e aos hospedeiros vertebrados e invertebrados, que influenciam na evolução da doença, a DC representa atualmente um dos maiores desafios terapêuticos e vacinais em medicina tropical. A ausência de um método profilático e imunoterápico eficientes têm alto custo financeiro anual à sociedade, cerca de US\$ 7 bilhões, incluindo US\$ 630 milhões em custos de cuidados de saúde, além de 800,000 anos de vida ajustados por incapacidade (LEE *et al.*, 2013). O desenvolvimento de uma vacina para DC traria, além da economia de custos, os benefícios para a saúde, tornando sua fabricação viável financeiramente (MARTIN & TARLETON, 2004; LEE *et al.*, 2010), porém, até o momento nenhuma vacina para DC foi testada em humanos. Muitos esforços têm sido demandados para o desenvolvimento dessa vacina (doses subletais ou cepas com virulência atenuada do parasito, formas culturais vivas inativadas, frações celulares com antígenos purificados e vacinas de DNA) no entanto, ainda não se obteve um produto capaz de evitar a parasitemia e anular totalmente a mortalidade (RODRIGUES, 2017, SLATHIA & SHARMA, 2018). São vários os fatores que impedem que essa vacina seja desenvolvida, como informações restritas (ALMEIDA & NAKAYASU, 2010) e grande variação gênica (ACOSTA-SERRANNO *et al.*, 2007; JUNQUEIRA *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2009, SOUZA, 2009) nas proteínas expressas na superfície celular do parasito em diferentes estágios e cepas, o que dificulta uma resposta eficiente do sistema imune do hospedeiro (ACOSTA-SERRANNO *et al.*, 2007; JUNQUEIRA *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2009, SOUZA, 2009). Além disto, o parasito apresenta sua superfície celular muito espessa e carregada negativamente (SOUTO-PADRON, 2002, LEE *et al.*, 2010), formando uma barreira de acesso à defesa do organismo, como o sistema complemento e anticorpos. E por último, grande parte dos estudos experimentais realizados até hoje utilizam um modelo animal que não mimetiza a resposta imune humana frente à infecção, já que não são capazes de produzir anticorpos anti- $\alpha$ Gal.

As glicoproteínas de superfície dos patógenos têm imensa importância para o desenho da vacina, pois são elas que irão acessar o sistema imunológico do hospedeiro, mesmo em casos de parasitos intracelulares (SLATHIA & SHARMA, 2018). Pensando em encontrar antígenos comuns às diferentes cepas de *T. cruzi*, foram realizados testes de micro-arranjos (Igor Almeida, Comunicação Pessoal). Destes antígenos, foram selecionados dois carboidratos ( $\alpha$ Gal e Rham) para testes. Sabe-se que o anticorpo anti- $\alpha$ Gal é um anticorpo natural importante no combate da infecção por *T. cruzi*. No entanto, carboidratos são pouco imunogênicos e para aumentar sua imunogenicidade, estes carboidratos foram acoplados à partículas semelhantes a vírus Q $\beta$ , capazes de induzir potentes respostas de células T, já que são rapidamente englobadas e

processadas por macrófagos e CDs (BRAUN *et al.*, 2012; HOLANDA *et al.*, 2017) aumentando sua imunogenicidade, além de já serem partículas testadas e aprovadas para uso humano por agências reguladoras (WARFIELD & AMAN, 2011; ZHANG *et al.*, 2015; HOLANDA *et al.*, 2017).

Para nossos experimentos foram usados camundongos geneticamente deficientes para  $\alpha$ Gal que tem sua resposta imunológica parcialmente semelhante ao humano. O primeiro passo foi comparar estes animais com os animais selvagens, e, como esperado, foi constatada uma maior resistência dos animais  $\alpha$ 1,3GT-KO evidenciada pela parasitemia mais baixa e maior sobrevivência, mesmo sob inóculos letais. Provavelmente a diferença entre as sobrevivências dos animais  $\alpha$ 1,3GT-KO e  $\alpha$ 1,3GT-WT se dê pelo intenso processo inflamatório gerado pela alta parasitemia nos animais  $\alpha$ 1,3GT-WT, levando à uma debilidade física destes animais e, posteriormente à morte. Além disso, o pico de tripomastigotas circulantes é influenciado pelo inóculo ministrado, quanto maior o inóculo, mais precoce é o pico parasitêmico.

Com o intuito de testar possíveis candidatos vacinais, os animais  $\alpha$ 1,3GT-KO foram sensibilizados (ou não) com  $\alpha$ Gal. Esta sensibilização ocorreu para que os animais já tenham a concentração do anticorpo aumentada no momento da infecção. Com isto, foi possível determinar se este anticorpo é capaz de prevenir a doença ou até mesmo da morte causada pelo parasito. Os animais foram imunizados com a partícula Q $\beta$  contendo (ou não) cerca de 180 partículas de  $\alpha$ Gal. Esta imunização foi capaz de aumentar em cerca de três vezes a quantidade de anticorpos anti-  $\alpha$ Gal circulantes no sangue, se mantendo alta ao longo de toda a fase aguda e boa parte da fase crônica. Aumento semelhante na produção de anticorpos anti- $\alpha$ Gal foi descrito em humanos por AVILA, ROJAS & GALILI (1989), quando observaram que estes anticorpos circulantes passaram de 1 para 3% após a infecção por *T. cruzi*. Os animais do grupo controle apresentaram uma grande diferença no número de formas circulantes a partir do sétimo dia, quando comparados ao grupo imunizado. Este resultado parece estar associado ao aumento significativo dos níveis de anticorpos anti- $\alpha$ Gal circulantes nos animais vacinados. Em 1982, KRETTLI & BRENER descreveram o anticorpo lítico (anti- $\alpha$ Gal), capaz de se ligar à forma tripomastogota viva, sendo encontrada somente em infecções ativas e um dos principais mecanismos para o controle do parasito no organismo, assim como já descrito por alguns autores (ALMEIDA *et al.*, 1991; GAZZINELLI *et al.*, 1991; GONZÁLEZ *et al.*, 1995; LaTEMPLE & GALILI, 1998; CHIANG *et al.*, 2000). O aumento exorbitante da parasitemia é acompanhada pela perda do peso corporal dos animais. TEIXEIRA, GAZZINELLI & SILVA (2002) demonstraram uma marcante resposta inflamatória em animais experimentais no início da infecção, com grande produção de citocinas inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Provavelmente esta perda de peso seja uma consequência deste intenso processo inflamatório

levando também a morte do animal. Os dados dos animais imunizados corroboram esse raciocínio, visto que apresentaram uma baixa parasitemia, manutenção do peso corporal e sobrevivência de todos os animais até o final do experimento.

Foi possível notar a partir desses dados que Q $\beta$ -VLP se mostrou altamente imunogênica quando associado à múltiplas cópias do  $\alpha$ Gal, sendo capaz de controlar a parasitemia. Entre os vírus recombinantes, os vetores adenovirais são considerados uma das plataformas mais eficientes para a vacinação, devido à sua capacidade de induzir respostas de memória mediadas por linfócitos T (HOLANDA *et al.*, 2017). Resultados semelhantes foram encontrados quando adicionados peptídeos P10 ao VLP em testes de vacinas para *Paracoccidioides brasiliensis* (HOLANDA *et al.*, 2017). A inibição da reatividade com o soro de animais infectados confirmou a especificidade do anticorpo anti- $\alpha$ Gal após o tratamento do antígeno com a enzima  $\alpha$ Galactosidase *Green coffee beans*. Os antígenos tratados com essa enzima, e, portanto, que perderam os epítomos  $\alpha$ Gal se assemelharam aos controles, diminuindo em até 70% a reatividade e corroborando com resultados obtidos por SOARES *et al.*, (2012) e VALLEJO *et al.*, (2011) após o uso desta enzima.

Sabe-se que cepas de *T. cruzi* I induzem baixo parasitismo em pacientes chagásicos humanos, enquanto cepas de *T. cruzi* II parecem ser responsáveis por lesões teciduais e alta parasitemia (FREITAS *et al.*, 2005). Esta afirmação é condizente com nossos achados, uma vez que os animais infectados (controles) com a cepa Colombiana (*T. cruzi* I) apresentou baixíssima parasitemia, quando comparada com os animais infectados com a cepa Y (*T. cruzi* II). O *T. cruzi* VI compreende subpopulações que compartilham características comuns com as populações híbridas, como o clone CL-Brener (SOARES *et al.*, 2012). A cepa Colombiana e o clone CL-Brener foram encontradas durante longo tempo na circulação dos animais, o que era de se esperar uma vez que a TcI é composta por formas largas (BRENER, 1965), sendo que o clone CL-Brener também apresenta essa característica (BRENER, 1977). Estes parasitos são caracterizados por apresentarem miotropismo, baixa virulência e maior resistência aos anticorpos do hospedeiro. Em contrapartida, a cepa Y possui a forma delgada, apresentando alta virulência, macrofagotropismo, parasitemia precoce e maior susceptibilidade aos anticorpos circulantes (ANDRADE, 1974; BRENER, 1965; BRENER, 1969).

Resultados deste estudo mostraram que os animais imunizados com Q $\beta$ - $\alpha$ Gal apresentaram após a imunização altos níveis desse anticorpo anti-  $\alpha$ Gal circulante no corpo e essas altas taxas perpetuam durante a infecção experimental. Dados semelhantes são encontrados na infecção humana, quando, com raras exceções, pacientes em fases agudas ou crônicas apresentam altos títulos de anticorpos líticos anti- $\alpha$ Gal (ALMEIDA *et al.*, 1994;

GAZZINELLI, *et al.*, 1991; ALMEIDA *et al.*, 1991, AVILA *et al.*, 1989; ANTAS *et al.*, 1999; GONZALES *et al.*, 1996; MEDRANO-MERCADO *et al.*, 1996; ALMEIDA *et al.*, 1997; DE ANDRADE *et al.*, 1996; NAKAYASU, *et al.*, 2012). Sendo estes anticorpos, os principais mecanismos imunes do hospedeiro no controle da parasitemia, em ambos os estágios da doença (ALMEIDA *et al.*, 1994; GAZZINELLI, *et al.*, 1991; ALMEIDA *et al.*, 1991, PEREIRA-CHIOCCOLA. *et al.*, 2000; NAKAYASU, *et al.*, 2012). SOARES *et al.* (2012) mostraram que soros de pacientes com DC, exibem títulos anti- $\alpha$ Gal superiores dos indivíduos saudáveis ou infectados por bactérias. Em pacientes chagásicos agudos e crônicos, anticorpos anti- $\alpha$ Gal têm um poder lítico mais elevado contra tripomastigotas de *T. cruzi*, sendo crucial para diminuir os níveis de parasitemia durante a infecção (GAZZINELLI *et al.*, 1991, ALMEIDA *et al.*, 1991; ALMEIDA *et al.*, 1994). A manutenção ao longo de toda infecção das taxas de anticorpos líticos circulantes se dá provavelmente porque a maioria dos glicoconjugados do *T. cruzi* estão na superfície externa das células ou secretados. Além disso, durante seu ciclo de vida, os tripomastigotas são capazes de liberar vesículas extracelulares contendo glicoproteínas da sua superfície. Essas vesículas, quando purificadas exibiram um padrão pró-inflamatório durante a interação parasito-hospedeiro (SOARES *et al.*, 2012).

O controle da infecção pelo *T. cruzi* requer uma forte resposta imune humoral e celular, e o resultado da interação parasito-hospedeiro nos estágios iniciais da infecção é extremamente importante (BASSO, 2013). No caso da imunização esse controle é verificado em partes, a parasitemia não é evitada, no entanto, ela acontece em baixo nível. Os nossos resultados, os mostraram que os animais infectados com a cepa Y não imunizados apresentaram em média  $3.000 \times 10^4$  ft no pico de parasitemia, contra apenas  $2 \times 10^4$  nos animais imunizados. Enquanto que na infecção com o clone CL-Brener, os animais controles apresentaram cerca de 5x mais tripomastigotas que os animais imunizados. Em ambos os casos houve uma infecção robusta e a imunização foi responsável pela sobrevivência de 100% ou 60% dos animais, respectivamente. No entanto, a cepa Colombiana apresentou uma infecção branda, com 100% de sobrevivência dos animais, independentemente da imunização. Sabe-se que as formas tripomastigotas apresentam diferentes padrões de glicoproteínas na sua superfície, podendo apresentar mais ou menos epítomos  $\alpha$ Gal. Segundo SOARES *et al.* (2012), os níveis de  $\alpha$ -galactosilação O-linked podem variar entre as cepas e, portanto, a capacidade do hospedeiro em acabar com o parasito usando esses anticorpos, o que pode significar uma maior proporção de acessos dos anticorpos líticos ao parasito. Os parasitos pertencentes à cepa Y apresentam maior expressão deste açúcar na superfície, seguidos das cepas Colombiana e CL. Além disso, a cepa Y apresenta forma tripomastigota delgada, que é naturalmente mais susceptível a lise

pelo complemento do que as formas largas (CL-Brener e Colombiana) (KRETTLI & BRENER, 1982). Já os animais infectados com o clone CL-Brener, quando imunizados, apresentam altos níveis de anticorpos líticos no momento da infecção, estando, portanto, mais preparados para combater a infecção e aumentando a chance de sobrevivência.

A patologia da cardiomiopatia chagásica é marcada por uma miocardite crônica e progressiva, com infiltrados inflamatórios difusos, incluindo linfócitos, plasmócitos, macrófagos e eosinófilos com vários graus de fibrose intersticial (KRANSDORF *et al.*, 2016; BENCK, KRANSDORF & PATEL, 2018). Em experimentos com cães, foram evidentes o aumento de células inflamatórias no miocárdio de animais infectados com a cepa Y e Colombiana quando comparados aos animais não infectados (CALIARI *et al.*, 2002; GUEDES *et al.*, 2009; DINIZ *et al.*, 2010). Nossos resultados mostraram em todos os animais, independente da cepa ou do tempo de infecção, a presença de infiltrados inflamatórios predominantemente mononuclear caracterizados pela presença de linfócitos e distribuídos de forma difusa. Segundo REIS *et al.* (1993) as lesões inflamatórias na DC têm um grande número de células T, especificamente linfócitos CD8. Os animais imunizados com o  $\alpha$ Gal e infectados com o clone CL-Brener apresentaram uma inflamação discreta tanto com 14 DPI quanto com 63 DPI, enquanto que os controles apresentaram em pelo menos um dos momentos, inflamação moderada. Isso pode ser indício de uma melhor resposta à infecção, já que justamente esse grupo é o único que manteve uma sobrevivência estatisticamente diferente. Os animais infectados com a cepa Colombiana com apenas 21 dias já foi possível observar nos animais controles uma inflamação moderada que perpetua até o final do experimento, enquanto que nos animais imunizados com  $\alpha$ Gal com 21 dias a inflamação era leve, chegando a moderada com 63 DPI.

A fibrose parece ser um bom indicador da gravidade da forma clínica. VOLPE *et al.* (2018) demonstraram maior letalidade entre os pacientes humanos chagásicos que apresentavam fibrose que os que não apresentavam. No entanto, fibrose focal pode estar presente mesmo em indivíduos com a forma indeterminada da DC (CARRASCO *et al.*, 1990; SARABANDA *et al.*, 2005; NOVA-RABELO *et al.*, 2018). Os animais analisados neste experimento não chegaram a desenvolver fibrose, o que nos permite supor que eles não tiveram tempo suficiente. Com 63 DPI os animais infectados com a cepa Colombiana ainda não cronificaram, enquanto que grande parte dos os animais infectados com o clone Cl-Brener morreram antes dos 40 DPI. No entanto, uma análise imunológica aprofundada se faz necessária para entender melhor esses resultados histológicos.

Nesse contexto, podemos acreditar que este antígeno apresentou uma resposta parcialmente protetora frente às infecções com as diferentes cepas de *T. cruzi*. A vacina não evitou a presença e replicação dos *T. cruzi* no sangue, no entanto, a mortalidade dos animais foi diminuída substancialmente, em alguns casos, sendo evitada. Vale ressaltar, que apesar de inúmeras pesquisas para o desenvolvimento de vacinas para DC baseadas em  $\alpha$ Gal, esta é a primeira a utilizar o VLP como adjuvante. Mostramos aqui a capacidade da vacina baseada em  $\alpha$ Gal ativar o sistema imune, induzindo uma proteção em camundongos geneticamente deficientes em  $\alpha$ Gal quando desafiados com um clone letal de *T. Cruzi*, suportando a hipótese que a vacinação modifica a resposta imune para melhorar o prognóstico da infecção. No entanto esta vacina deve ser melhor estudada e modificada para resultados mais amplos e consistentes

Por outro lado, nosso estudo demonstrou que formulações com Rham e  $\alpha$ Gal/Rham não resultaram em uma proteção aos animais imunizados. De acordo com os resultados das imunizações, independente se infectados com a cepa Colombiana ou clone CL-Brener, não houve melhoras nas respostas avaliadas com relação aos animais controles. No entanto, este foi o primeiro teste com a Rham como candidato vacinal para DC, podendo, a melhora dos resultados estar condicionado à mudanças no protocolo de apresentação do antígeno e/ou protocolo de imunizações.

## ***Conclusão***

## 7 CONCLUSÃO

Pudemos perceber que os animais deficientes para  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase ( $\alpha$ GalT-KO) apresentaram uma menor parasitemia e maior taxa de sobrevivência quando comparado com os animais selvagens ( $\alpha$ GalT-WT), comprovando a importância do anticorpo anti- $\alpha$ Gal no controle da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Esses animais se mostraram, portanto, um bom modelo para a infecção experimental e análise da variação dos níveis desse anticorpo no organismo. Sabendo da importância do anti- $\alpha$ Gal na resposta à infecção por *T. cruzi*, este modelo se faz essencial. Os animais imunizados com 180 ou 540 resíduos de  $\alpha$ Gal - Q $\beta$ ( $\alpha$ -Gal)<sub>180</sub> ou Q $\beta$ ( $\alpha$ -Gal)<sub>540</sub> – induziram altos títulos de anticorpos anti- $\alpha$ Gal e maior sobrevivência dos animais, mesmo em infecções letais como com o clone CL-Brener, demonstrando a potencialidade deste carboidrato como partícula vacinal. No entanto, animais imunizados com Q $\beta$ ( $\alpha$ -Gal)<sub>180</sub> apresentaram menor quantidade de *T. cruzi* circulantes quando comparados com os animais Q $\beta$ ( $\alpha$ -Gal)<sub>540</sub> infectados com a mesma carga parasitária, devendo, essa diferença ser estudada para aperfeiçoamento da partícula. Todavia, este foi o primeiro estudo vacinal utilizando o  $\alpha$ Gal associado à uma VLP como adjuvante, sendo necessários outros estudos para o aperfeiçoamento da vacina.



## *Referências*

## 8 REFERÊNCIAS

1. Abdel-Motal *et al.* (2009) Mechanism for increased immunogenicity of vaccines that form *in vivo* immune complexes with the natural anti-Gal antibody. **Vaccine** 27: 3072–3082
2. Abdel-Motal, U. M., Wigglesworth, K. & Galili, U. (2009b) Intratumoral injection of alpha-gal glycolipids induces a protective anti-tumor T cell response which overcomes Treg activity. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 58, n. 10, p. 1545-1556
3. Acosta-Serrano, A., Hutchinson, C., Nakayasu, E.S., Almeida, I.C. & Carrington, M. (2007) Comparison and evolution of the surface architecture of trypanosomatid parasites. in *Trypanosomes: After the genome* (eds. Barry, J.D., Mottram, J.C., McCulloch, R. & Acosta-Serrano, A.) 319-337 (Horizon Scientific Press, Norwich, UK).
4. Akache B., *et al.* (2016) Anti-IgE Qb-VLP Conjugate Vaccine Self-Adjuvants through Activation of TLR7. **Vaccines** (Basel). 4(1): 3.
5. Allen S. *et al.* (2013) Structure of a Complex Phosphoglycan Epitope from gp72 of *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry** Vol. 288, No. 16, pp. 11093–11105
6. Almeida, I. C. *et al.* (1991) Complement-mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes by human anti-alpha-galactosyl antibodies. **Journal of Immunology**, v. 146, n. 7, p. 2394-2400.
7. Almeida, I. C. *et al.* (1994) Lytic anti-alpha-galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease recognize novel O-linked oligosaccharides on mucin-like glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. **The Biochemical Journal**, v. 304, n. Pt 3, p. 793-802.
8. Almeida, I.C. & Nakayasu, E.S. (2010) Subcellular proteomics and global analysis of posttranslational modifications to study functional roles of *Trypanosoma cruzi* molecules. in **Open Parasitol J**, Vol. 4 167-177.
9. Almeida, I.C., Covas, D.T., Soussumi, L.M. & Travassos, L.R. (1997) A highly sensitive and specific chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of active *Trypanosoma cruzi* infection. **Transfusion** 37, 850-857.
10. Ambühl, P. M. *et al.* (2007) A vaccine for hypertension based on virus-like particles: preclinical efficacy and phase I safety and immunogenicity. **Journal of Hypertension**, v. 25, n. 1, p. 63-72.
11. Andrade S.G. (1974). Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. **Rev.Pat.Trop.** 65-121.

12. Andrade, A.L.S.S., *et al.* (2004) Short report: benznidazole efficacy among *Trypanosoma cruzi*-infected adolescents after a six-year follow-up. **Am J Trop Med Hyg** 71, 594-597.
13. Andrews, N.W. & Colli, W. (1982) Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. **J Protozool** 29, 264-269.
14. Anraku, K *et al.*, (2017) The design and synthesis of an  $\alpha$ -Gal trisaccharide epitope that provides a highly specific anti-Gal immune response. **Org. Biomol. Chem.**
15. Antas PR, Medrano-Mercado N, Torrico F, Ugarte-Fernandez R, Gomez F, Correa Oliveira R, Chaves AC, Romanha AJ, Araujo-Jorge TC. (1999) Early, intermediate, and late acute stages in Chagas' disease: a study combining anti-galactose, IgG, specific serodiagnosis, and polymerase chain reaction analysis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**; 61(2):308–314.
16. Araújo, R. N. *et al.* (2016) *Amblyomma sculptum* tick saliva:  $\alpha$ -Gal identification, antibody response and possible association with red meat allergy in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 46, n. 3, p. 213-220
17. Ashcroft, A. E. *et al.* (2005) Engineering thermal stability in RNA phage capsids via disulphide bonds. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 5, n. 12, p. 20342041.
18. Ashmus, R. A. *et al.* (2013) Potential use of synthetic alpha-galactosyl-containing glycotopes of the parasite *Trypanosoma cruzi* as diagnostic antigens for Chagas disease. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 11, n. 34, p. 5579-5583
19. Avila, J. L., Rojas, M. & Galili, U. (1989) Immunogenic Gal alpha 1-3Gal carbohydrate epitopes are present on pathogenic American *Trypanosoma* and *Leishmania*. **Journal of Immunology**, v. 142, n. 8, p. 2828-2834.
20. Ayyari M *et al.* (2014) Antitrypanosomal Isothiocyanate and Thiocarbamate Glycosides from *Moringa peregina*. **Planta Med**; 80: 86–89
21. Bachmann MF, Jennings GT (2010) Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. **Nat Rev Immunol** 10: 787–796.
22. Banchereau J, Steinman RM. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**;392:245–52.
23. Barrett M.P. Burchmore R.J., Stich A., Lazzari J.O., Frasci A.C., Cazzulo J., Krishna S. (2003) The tripanosomíases. **Lancet**, 362, 1469-1480.
24. Basso, B. (2013). Modulation of immune response in experimental Chagas disease. **World Journal of Experimental Medicine**, v. 3, n. 1, p. 1-10,

25. Bastida-Corcuera FD. *et al* (2005) *Trichomonas vaginalis* Lipophosphoglycan Mutants Have Reduced Adherence and Cytotoxicity to Human Ectocervical Cells. **Eukaryot Cell**. (11): 1951–1958
26. Beaumier C.M.,*et al.* (2016) Status of vaccine research and development of vaccines for Chagas disease. **Vaccine** 34, 2996–3000.
27. Benck, L., Kransdorf, E., & Patel, J. (2018). Diagnosis and Management of Chagas Cardiomyopathy in the United States. **Current Cardiology Reports**, 20(12). doi:10.1007/s11886-018-1077-5
28. Bermudez, J. *et al.* (2016) Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 156, p. 1-16.
29. Bern, C. & Montgomery, S.P. (2009). An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America** 49, e52-54
30. Bern, C. (2011) Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. **The New England journal of medicine** 364, 2527-2534.
31. Bhatia, V., Sinha, M., Luxon, B. & Garg, N. (2004) Utility of the *Trypanosoma cruzi* sequence database for identification of potential vaccine candidates by *in silico* and *in vitro* screening. **Infect Immun** 72, 6245-6254.
32. Blanken, W. M. & Van Den Eijnden, D. H. (1985) Biosynthesis of terminal Gal alpha 13Gal beta 1-4GlcNAc-R oligosaccharide sequences on glycoconjugates. Purification and acceptor specificity of a UDP-Gal:N-acetyllactosaminide alpha 1-3 galactosyltransferase from calf thymus. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 24, p. 12927-12934.
33. Borges, J.D., *et al.*, (2006). Seroprevalence of Chagas disease in schoolchildren from two municipalities of Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil; six years following the onset of epidemiological surveillance. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. 48(2), 81-86.
34. Braun M, Jandus C, Maurer P, Hammann-Haenni A, Schwarz K, Bachmann MF, *et al.* (2012). Virus-like particles induce robust human T-helper cell responses. **Eur J Immunol**; 42:330–40
35. Brener Z. (1965). Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, 59:19-26,
36. Brener Z. (1969). The behavior of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. **Ann.Trop.Med.Parasitol**. 63, 215-220

37. Brener, Z. (1977) Intraspecific variations in *Trypanosoma cruzi*: Two Types of parasite populations presenting distinct characteristics. In: Scientific Publication n. 347. **Chagas Livrare**, PAMO, 11-21
38. Brener, Z. (1984) Recent advances in the chemotherapy of Chagas' disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 79, 149-155.
39. Brener, Z. (1987) Intraspecific variation in "*Trypanosoma cruzi*": two types of parasite populations presenting distinct characteristics. Washington, D.C., **Pan American Health Organization (PAHO - Scient Publ)**. 347. 11-21.
40. Bretaña, A. *et al.* (1992) American *Leishmania spp.* and *Trypanosoma cruzi*: galactosyl alpha(1-3) galactose epitope localization by colloidal gold immunocytochemistry and lectin cytochemistry. **Experimental Parasitology**, v. 74, n. 1, p. 27-37.
41. Brito, C. R. N. *et al.* (2016) Virus-like particle display of the  $\alpha$ -Gal epitope for the diagnostic assessment of Chagas disease. **ACS Infectious Diseases**, v. 2, n. 12, p. 917-922.
42. Burleigh, B.A., Woolsey, A.M., (2002). Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. **Cell Microbiol.** 4, 701\_711.
43. Cabezas-Cruz A. *et al.*, (2017) Effect of blood type on anti- $\alpha$ -Gal immunity and the incidence of infectious diseases. **Experimental & Molecular Medicine** 49, e301
44. Caliarì MV, Machado RP, Lana M, Cajá RAF, Carneiro CM, Bahia MT, Santos CAB, Magalhães GA, Sampaio IBM, Tafuri WL (2002). Quantitative analysis of cardiac lesions in chronic canine chagasic cardiomyopathy. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** 44(5):273-8.
45. Camargo, E.P. (1964) Growth and Differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 6, 93-100.
46. Camargo, M.M., *et al.* (1997) Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. **J Immunol** 158, 5890-5901.
47. Carrasco HA, Guerrero L, Parada H, Molina C, Vegas E, Chuecos R. (1990) Ventricular arrhythmias and left ventricular myocardial function in chronic chagasic patients. **Int J Cardiol**;28:35-41.
48. Chagas, C. Nova tripanozomíase humana – Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. SP., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Revista Brasil-Médico**, 1909
49. Chen, W *et al.*, (2011) L-Rhamnose Antigen: A Promising Alternative to r-Gal for Cancer Immunotherapies. **ACS Chem. Biol.** 6, 185-191

50. Cheng, H.-M., 1998. Natural cryptic autoantibodies. **Autoimmunity** 27, 99–108
51. Chiang, T. R. *et al.* (2000) Anti-Gal antibodies in humans and 1, 3 $\alpha$ -galactosyltransferase knock-out mice. **Transplantation**, v. 69, n. 12, p. 2593-2600.
52. Cornuz, J. *et al.* (2008) A Vaccine against nicotine for smoking cessation: a randomized controlled trial. **PLoS One**, v. 3, n. 6, p. 1-10.
53. Coura & Dias (2009) Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**;(Supl.1):31-40.
54. Cowan, P. J. & d'Apice, A. J. F. (2003) Galactose- $\alpha$ 1,3-galactose knockout mouse: a surrogate recipient. **Current Opinion in Organ Transplantation**, v. 8, n. 1, p. 70-75.
55. Dahl, K. *et al.* (2006) Glucose intolerance in a xenotransplantation model: studies in alpha-gal knockout mice. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 114, n. 11, p. 805-811.
56. de Andrade AL, Zicker F, de Oliveira RM, Almeida Silva S, Luquetti A, Travassos LR, Almeida IC, de Andrade SS, de Andrade JG, Martelli CM. (1996) Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. **Lancet**; 348(9039):1407–1413.
57. De Marchi, C.R. *et al.* (2011). Evaluation of a Recombinant *Trypanosoma cruzi* Mucin-Like Antigen for Serodiagnosis of Chagas' Disease. **Clinical And Vaccine Immunology**, Nov, p. 1850–1855
58. Deriy, L. *et al.* (2005) *In vivo* targeting of vaccinating tumor cells to antigen-presenting cells by a gene therapy method with adenovirus containing the alpha1,3galactosyltransferase gene. **Cancer Gene Therapy**, v. 12, n. 6, p. 528-539.
59. DIAS E., 1934. Estudos sobre o Schizotrypanum cruzi. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 28: 1-110. Dias E. Laranja F.S., Miranda A. & Nobrega G. (1956) Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. **Circulation** 14, 1035-1060.
60. Dias J.C. (1992) Epidemiology of Chagas disease. In: Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, M.S., Rassi, A. (eds), Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. **ISBT Brasil**, São Paulo 49-80.
61. Dias J.C. (2009) Elimination of Chagas disease transmission: perspectives. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 104 Suppl 1, 41-45.
62. Dias J.C., Prata,A., Correia, D. (2008) Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 41, 193-196.
63. DIAS E., 1933. Estudos sobre o Schizotrypanum cruzi. Thesis. Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 115p.

64. Dias, JCP *et al* (2016). II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Epidemiol. Serv. Saúde* v. 24, n. 1
65. Diniz L de F, Caldas IS, Guedes PM, Crepalde G, Lana M, Carneiro CM, Talvani A, Urbina JA, Bahia MT (2010). Effects of ravuconazole treatment on parasite load and immune response in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 54(7):2979-86.
66. Doença de Chagas, Drugs for Neglected Diseases initiative. Disponível em: <https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/> acesso em 10 dez. 2018
67. Dominguez MR, Silveira EL, de Vasconcelos JR, de Alencar BC, Machado AV, Bruna-Romero O, *et al* (2011) subdominant/cryptic CD8 T cell epitopes contribute to resistance against experimental infection with a human protozoan parasite. *PLoS One*. 6(7):e22011
68. Doucet M, El-Turabi A, Zabel F, Hunn BHM, Bengoa-Vergniory N, Cioroch M, *et al*. (2017) Preclinical development of a vaccine against oligomeric alpha-synuclein based on virus-like particles. *PLoS ONE* 12(8): e0181844
69. DUTRA, W., O.; MENEZES, C., A., S.; *et al*, Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease, **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, 104(Suppl. I), 208-218, 2009.
70. Epting, L. C., Coates, M. B., Engman. M. (2010). Molecular mechanisms of host cell invasion *T. cruzi*. *Parasitology*. 126,283-291.
71. Farrow A.L., *et al*. (2016) A Novel Vaccine Approach for Chagas Disease Using Rare Adenovirus Serotype 48 Vectors. **Viruses**.
72. Ferraz, L.R. de M, *et al*. (2018) Technological innovation strategies for the specific treatment of Chagas disease based on Benznidazole. **Acta Tropica**.
73. Ferreira, R. C. *et al*. (2016) Colonization of *Rhodnius prolixus* gut by *Trypanosoma cruzi* involves an extensive parasite killing. **Parasitology**, v. 143, n. 4, p. 434-443.
74. Fiedler, J. D. *et al*. (2010) RNA-directed packaging of enzymes within virus-like particles. **Angewandte Chemie**, v. 49, n. 50, p. 9648-9651.
75. Fiedler, J. D. *et al*. (2012) Engineered mutations change the structure and stability of a virus-like particle. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 8, p. 2339-2348.
76. Filardi LS, Brener Z, (1987). Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 81: 755–759.
77. Freitas JM, Lages-Silva E, Crema E, Pena SD, Macedo AM, (2005). Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. **Int J Parasitol** 35: 411–417

78. Fulurija, A. *et al.* (2008) Vaccination against GIP for the treatment of obesity. **PLoS One**, v. 3, n. 9, p. 1-11.
79. Galili U, Mandrell RE, Hamadeh RM, Shohet SB, Griffis JM (1988). Interaction between human natural anti- $\alpha$ -galactosyl immunoglobulin G and bacteria of the human flora. **Infect Immun**; 56:1730–7.
80. Galili U, Rachmilewitz EA, Peleg A, Flechner I. (1984) A unique natural human IgG antibody with anti- $\alpha$ -galactosyl specificity. **J Exp Med** 1984; 160:1519–31
81. Galili U. (2005) The  $\alpha$ -gal epitope and the anti-Gal antibody in xenotransplantation and in cancer immunotherapy. **Immunol Cell Biol**; 83:674–686.
82. Galili U. (2013b) Discovery of the natural anti-Gal antibody and its past and future relevance to medicine. **Xenotransplantation**: 20: 138–147
83. Galili, U. (1991) The natural anti-Gal antibody: evolution and autoimmunity in man. **Immunol Ser** 55, 355-373
84. Galili, U. (1993b) Interaction of the natural anti-Gal antibody with  $\alpha$ -galactosyl epitopes: a major obstacle for xenotransplantation in humans. **Immunology Today**, v. 14, n. 10, p. 480-482.
85. Galili, U. (2013) Anti-Gal: an abundant human natural antibody of multiple pathogenesis and clinical benefits. **Immunology**, 140, 1–11
86. Galili, U. (2015) Significance of the evolutionary  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase (GGTA1) gene inactivation in preventing extinction of apes and old world monkeys. **Journal of Molecular Evolution**, v. 80, n. 1, p. 1-9.
87. Galili, U. (2017)  $\alpha$ -Gal Nanoparticles in wound and burn healing acceleration. **Advances in Wound Care**, v. 6, n. 3, p. 81-92.
88. Galili, U. *et al.* (1987) Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal $\alpha$ 1-3Gal epitope in primates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 5, p. 1369-1373.
89. Galili, U. *et al.* (1988a) Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of  $\alpha$ -galactosyl epitopes on nucleated cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 33, p. 17755-17762.
90. Galili, U., Wigglesworth, K. & Abdel-Motal, U. M. (2010) Accelerated healing of skin burns by anti-Gal/ $\alpha$ -gal liposomes interaction. **Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 36, n. 2, p. 239-251.
91. Galili, U. *et al.* (1985) Human natural anti- $\alpha$ -galactosyl IgG. II. The specific recognition of  $\alpha$  (1-3)-linked galactose residues. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 162, n. 2, p. 573-582



92. Gary T. Jennings & Martin F. Bachmann. (2008) Review: The coming of age of virus-like particle vaccines. **Biol. Chem.**, Vol. 389, pp. 521–536
93. Gazzinelli, R. T. *et al.* (1991) Direct lysis of *Trypanosoma cruzi*: a novel effector mechanism of protection mediated by human anti-gal antibodies. **Parasite Immunology**, v. 13, n. 4, p. 345-356
94. Golgher, D. & Gazzinelli, R. T. (2004) Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. **Autoimmunity**, v. 37, n. 5, p. 399-409.
95. Gonzalez J, Neira I, Gutierrez B, Anaconda D, Manque P, Silva X, Marin S, Sagua H, Vergara U. (1996) Serum antibodies to *Trypanosoma cruzi* antigens in Atacamenos patients from highland of northern Chile. **Acta tropica.**; 60(4):225–236..
96. González, J. *et al.* (1995) Niveles de anticuerpos anti-Gal em personas infectadas y noinfectadas por *Trypanosoma cruzi*: probable inducción por bacterias y por el parásito. **Boletín Chileno de Parasitología**, v. 50, n. 1/2, p. 3-9.
97. Grauert, Houdayer & Hontebeyrie-Joskowciz (1993) *Trypanosoma cruzi* infection enhances polyreactive antibody response in an acute case of human Chagas' disease. **Clin Exp Immunol.** 1993 Jul;93(1):85-92.
98. Guedes PM, Veloso VM, Afonso LC, Caliari MV, Carneiro CM, Diniz LF, Marques-da-Silva EA, Caldas IS, Do Valle Matta MA, Souza SM, Lana M, Chiari E, Galvão LM, Bahia MT (2009). Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN-gamma, TNF-alpha, and low IL-10 production during the acute infection phase. **Vet Immunol Immunopathol.** 130(1- 2):43-52.
99. Hanford, E.J., Zhan, F.B., Lu, Y. & Giordano, A. (2007). Chagas disease in Texas: recognizing the significance and implications of evidence in the literature. **Social science & medicine** 65, 60-79
100. Holanda *et al.* (2017). Recombinant vaccines of a CD4+ T-cell epitope promote efficient control of *Paracoccidioides brasiliensis* burden by restraining primary organ infection. **PLoS Negl Trop Dis.** 2017 Sep; 11(9): e0005927.
101. Hong, V. *et al.* (2009) Analysis and optimization of copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition for bioconjugation. **Angewandte Chemie**, v. 48, n. 52, p. 9879-9883.
102. Hovlid *et al.*, (2014) Encapsidated Atom-Transfer Radical Polymerization in Q $\beta$  Virus-like Nanoparticles. **ACSNano.** Vol. 8, n. 8, 8003–8014
103. Huflejt, M. E., Vuskovic, M., Vasiliu, D., Xu, H., Obukhova, P., Shilova, N., Tuzikov, A., Galanina, O., Arun, B., Lu, K., and Bovin, N. (2009) Anti-carbohydrate antibodies of normal sera: findings, surprises and challenges. **Mol. Immunol.** 46, 3037–3049.
104. Jimenez, V. (2014) Dealing with environmental challenges: mechanisms of adaptation in *Trypanosoma cruzi*. **Research in Microbiology**, v. 165, n. 3, p. 155-165.

105. Johnson, H. R. *et al.* (2007) Solubilization and stabilization of bacteriophage MS2 in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 2, p.224-234.
106. Junqueira, C., *et al.* (2010) The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert reviews in molecular medicine** 12, e29.
107. Kang Y. *et al.*, (2016) Bacteriophage tailspikes and bacterial O-antigens as a model system to study weak-affinity protein-polysaccharide interactions. **J. Am. Chem. Soc**
108. Karmakar, P. *et al.* (2016) Synthesis of a Liposomal MUC1 Glycopeptide-Based Immunotherapeutic and Evaluation of the Effect of L-Rhamnose Targeting on Cellular Immune Responses. **Bioconjug Chem**; 27(1): 110–120
109. Keller, S. A. *et al.* (2010) Cutting edge: limited specialization of dendritic cell subsets for MHC class II-associated presentation of viral particles. **Journal of Immunology**, v. 184, n. 1, p. 26-29.
110. Khan, F. *et al.* (2015) Head-to-head comparison of soluble vs. Q $\beta$  VLP circumsporozoite protein vaccines reveals selective enhancement of NANP repeat responses. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. 1-18.
111. Kransdorf EP, Fishbein MC, LSC C, Patel JK, Velleca A, Tazelaar HD, *et al.* (2016) Pathology of chronic Chagas cardiomyopathy in the United States: a detailed review of 13 cardiectomy cases. **Am J Clin Pathol.**;146(2):191–8.
112. Krautz, G.M., Kissinger, J.C. & Krettli, A.U. (2000) The targets of the lytic antibody response against *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Today** 16, 31-34.
113. Krettli, A.U.; Brener, Z. (1982) Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to antiliving trypomastigote antibodies. **J. Immunol.** v.129, p.2009-2012
114. LaTemple, D. C. & Galili, U. (1998) Adult and neonatal anti-Gal response in knock-out mice for alpha1,3galactosyltransferase. **Xenotransplantation**, v. 5, n. 3, p. 191-196.
115. Lee BY, Bacon KM, Bottazzi ME, Hotez PJ. (2013) Global economic burden of Chagas disease: a 19 computational simulation model. **Lancet Infect Dis.** 13(4):342-348. 20 doi:10.1016/S1473-3099(13)70002-1
116. Lee, B.Y., Bacon, K.M., Connor, D.L., Willig, A.M. & Bailey, R.R. (2010) The potential economic value of a *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease) vaccine in Latin America. **PLoS neglected tropical diseases** 4, e916.
117. Leung *et al.*, (2017) Monitoring the Disassembly of Virus-like Particles by <sup>19</sup>F-NMR. **Journal of the American Chemical Society**, 139, 5277–5280
118. Li, X *et al* (2016) Targeting Tumor Cells by Natural Anti-Carbohydrate Antibodies Using Rhamnose-Functionalized Liposomes. **ACS Chem. Biol**

119. Li, X. *et al.*, (2017) Chemical Remodeling Cell Surface Glycans for Immunotargeting of Tumor Cells. **Carbohydrate Research**
120. Liang *et al.* (2008) Glycan arrays: biological and medical applications. **Current Opinion in Chemical Biology**, 12:86–92
121. Low *et al.*, (2014) Safety and immunogenicity of a virus-like particle pandemic influenza A (H1N1) 2009 vaccine: Results from a double-blinded, randomized Phase I clinical trial in healthy Asian volunteers. **Vaccine** 32; 5041–5048
122. Macher, B. A. & Galili, U. (2008) The Gal $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R ( $\alpha$ -Gal) epitope: a carbohydrate of unique evolution and clinical relevance. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1780, n. 2, p. 75-88.
123. Martin, D. & Tarleton, R. (2004). Generation, specificity, and function of CD8<sup>+</sup> T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunol Rev** 201, 304-317
124. Martinez V *et al.* (2012) Biosynthesis of UDP-4-keto-6-deoxyglucose and UDP-rhamnose in Pathogenic Fungi *Magnaporthe grisea* and *Botryotinia fuckeliana*. **J Biol Chem**; 287(2): 879–892
125. Martins, L.P.A.; Castanho, R.E.P.; Rosa, J.Á.; Silva, C.S.; Godoy, A.P.; Rosa, Rm. Caracterização biológica, histopatológica e análise de ácido nucléico de uma cepa *Trypanosoma cruzi* da região de Marília, SP. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36 n. 1, p. 35-39, jan-fev, 2003.
126. Maurer, P. & Bachmann, M. F. (2006) Therapeutic vaccines for nicotine dependence. **Current Opinion in Molecular Therapeutics**, v. 8, n. 1, p. 11-6.
127. McCluskie, M.J., *et al.* (2016) The effect of preexisting anti-carrier immunity on subsequent responses to CRM197 or Q $\beta$ -VLP conjugate vaccines, *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 38:3, 184-196.
128. Medrano-Mercado N, Luz MR, Torrico F, Tapia G, Van Leuven F, AraujoJorge TC. (1996) Acute-phase proteins and serologic profiles of chagasic children from an endemic area in Bolivia. **The American journal of tropical medicine and hygiene.**; 54(2):154–161.
129. Minning, T. A. *et al.* (2009) The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. **BMC Genomics**, v. 10, n. 370, p. 1-15.
130. Moura *et al.*, (2017) Virus-like Particle Display of the  $\alpha$ -Gal Carbohydrate for Vaccination against *Leishmania* Infection. **ACS Cent Sci**. 2017 Sep 27; 3(9): 1026–1031.
131. Murta SM, Romanha AJ, (19980. *In vivo* selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. **Parasitology** 116: 165–171.

132. Nakayasu, E.S. *et al.* (2012) Improved proteomic approach for the discovery of potential vaccine targets in *Trypanosoma cruzi*. **J Proteome Res.** January 1; 11(1): 237–246.
133. Nico D *et al* (2012). The adjuvanticity of *Chiococca alba* saponins increases with the length and hydrophilicity of their sugar chains. **Vaccine** Volume 30, Issue 21, Pages 3169-3179
134. Nobrega AA, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, Araujo WN. (2009). Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. **Emerg. Infect. Dis** 15: 653-655
135. Noya-Rabelo MM, Macedo CT, Larocca T, *et al.* (2018) The presence and extension of myocardial fibrosis in the undetermined form of Chagas' disease: a study using magnetic resonance. **Arq Bras Cardiol**;110:124–31.
136. Onzuka *et al.*, (2008) Application of Cyclophosphamide-Induced Tolerance in  $\alpha$ 1,3-Galactosyltransferase Knockout Mice Presensitized with Gal $\alpha$ 1–3Gal $\beta$ -4-GlcNAc Antigens. **Surg Today** 38:807–814
137. OPAS. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las américas. (2006).
138. Oyelaran, O., McShane, L. M., Dodd, L., and Gildersleeve, J. C. (2009) Profiling human serum antibodies with a carbohydrate antigen microarray. **J. Proteome Res.** 8, 4301–4310.
139. Penna, A. L. *et al* (2005). Manual de vigilância epidemiológica/Secretaria de Saúde
140. PEREIRA, I. R. *et al.* Severity of chronic experimental Chagas' heart disease parallels tumour necrosis factor and nitric oxide levels in the serum: models of mild and severe disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 3, p. 289-298, 2014.
141. Pereira-Chioccola VL, Acosta-Serrano A, Correia de Almeida I, Ferguson MA, Souto-Padron T, Rodrigues MM, Travassos LR, Schenkman S. (2000) Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti-alpha-galactosyl antibodies. **J Cell Sci.**; 113(Pt 7):1299–1307.
142. Pereira-Chioccola, V.L., Fragata-Filho, A.A., Levy, A.M., Rodrigues, M.M. & Schenkman, S. (2003) Enzyme-linked immunoassay using recombinant trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* can be employed for monitoring of patients with Chagas' disease after drug treatment. **Clinical and diagnostic laboratory immunology** 10, 826-830.
143. Pingel, S. *et al.* (1999) Purification and characterization of an alpha-galactosyltransferase from *Trypanosoma brucei*. **The Biochemical Journal**, v. 338, n. pt2, p. 545-551
144. Posekany *et al.*, (2002) Induction of Cytolytic Anti-Gal Antibodies in  $\alpha$ -1,3-Galactosyltransferase Gene Knockout Mice by Oral Inoculation with *Escherichia coli* O86:B7 Bacteria. **Infection and immunity**, 6215–6222

145. Posekany, K. J. *et al.* (2004) Suppression of Lewis lung tumor development in alpha 1,3 galactosyltransferase knock-out mice. **Anticancer Research**, v. 24, n. 2B, p. 605-612.
146. Quijano-Hernandez I & Dumonteil E, (2011) Advances and challenges toward a vaccine against Chagas disease. **Human Vaccines** 7 1184-1191.
147. Ramasamy, R & Rajakaruna, R. (1997) Association of malaria with inactivation of alpha1,3-galactosyl transferase in catarrhines. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1360, n. 3, p. 241-246.
148. Rassi Jr, A., Rassi, A. & Marin-Neto, J. A. (2010) Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402.
149. Reis DD, Apos A, Jones EM, Tostes S, Lopes ER, *et al.* (1993) Characterization of inflammatory infiltrates in chronic Chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- $\alpha$ <sup>+</sup> cells and dominance of granzyme A<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> lymphocytes. **Am J Trop Med Hyg**;48(5):637-44.
150. Reis DD, Apos A, Jones EM, Tostes S, Lopes ER, *et al.* (1993) Characterization of inflammatory infiltrates in chronic Chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- $\alpha$ <sup>+</sup> cells and dominance of granzyme A<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> lymphocytes. **Am J Trop Med Hyg**;48(5):637-44
151. Remme, J.H.F., *et al.* (2006) Chapter 22: Tropical Diseases Targeted for Elimination: Chagas Disease, Lymphatic Filariasis, Onchocerciasis, and Leprosy. in *Disease Control Priorities in Developing Countries* (eds. Jamison, D.T., *et al.*) Washington (DC).
152. Rhee, J. *et al.* (2012) Glycan-targeted virus-like nanoparticles for photodynamic therapy. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 8, p. 2333-2338.
153. Robinson, H.L. & Amara, R.R. (2005) T cell vaccines for microbial infections. **Nat Med** 11, S25-32
154. Rocha M.O. Teixeira, M.M.; Ribeiro, A.L. (2007). An update on the management of Chagas cardiomyopathy. **Expert Rev. Anti Infect**;; 5 (4): 727-743
155. Rodrigues, M. Vacina para doença de Chagas: uma experiência atual. FIOCRUZ, 2017. Disponível em <<http://chagas.fiocruz.br/vacinas/>>. Acesso em 17 de março de 2018
156. Rodrigues, M.M., Alencar, B.C., Claser, C. & Tzelepis, F. (2009) Immunodominance: a new hypothesis to explain parasite escape and host/parasite equilibrium leading to the chronic phase of Chagas' disease? **Braz J Med Biol Res** 42, 220-223.
157. Romaña C. Enfermedad de Chagas. **Lopez Libreros Editora**, Buenos Aires. 242p, 1963
158. Rossi, G. R. *et al.* (2005) Complete protection against melanoma in absence of autoimmune depigmentation after rejection of melanoma cells expressing alpha

- (1,3)galactosyl epitopes. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 54, n. 10, p. 999-1009.
159. Rossi, G. R. *et al.* (2008) Allogeneic melanoma vaccine expressing alphaGal epitopes induces antitumor immunity to autologous antigens in mice without signs of toxicity. **Journal of Immunotherapy**, v. 31, n. 6, p. 545-554.
  160. Ryan C. *et al* (2011) Chemical Structure of *Trichomonas vaginalis* Surface Lipoglycan: a role for short galactose ( $\beta$ 1-4/3) n-acetylglucosamine repeats in host cell interaction. **J Biol Chem.**; 286(47): 40494-40508
  161. Sales Junior P.A., *et al.* (2017) Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. **Am J Trop Med Hyg.** 97(5):1289-1303
  162. Sarabanda AV, Sosa E, Simoes MV, Figueiredo GL, Pintya AO, Marin-Neto JA. (2005) Ventricular tachycardia in Chagas' disease: a comparison of clinical, angiographic, electrophysiologic and myocardial perfusion disturbances between patients presenting with either sustained or nonsustained forms. **Int J Cardiol**;102:9-19.
  163. Schmunis, G.A; Yadon, Z. E. (2010) Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica.** v. 115, p. 14-21
  164. Schwarz, B. & Douglas, T. (2015) Development of virus-like particles for diagnostic and prophylactic biomedical applications. Wiley Interdisciplinary Reviews. **Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 7, n. 5, p. 722-735.
  165. Sheridan R.T.C. *et al.* (2014) Rhamnose Glycoconjugates for the Recruitment of Endogenous Anti-carbohydrate Antibodies to Tumor Cells, **Chembiochem.** 15(10): 1393-1398
  166. Soares, R.P. *et al.* (2012) Intraspecies Variation in *Trypanosoma cruzi* GPI-Mucins: Biological Activities and Differential Expression of  $\alpha$ -Galactosyl Residues. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 87(1), pp. 87-96
  167. Souto-Padron, T. (2002) The surface charge of trypanosomatids. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias** 74, 649-675.
  168. Souto-Padron, T. *et al.* (1994) Distribution of alpha-galactosyl-containing epitopes on *Trypanosoma cruzi* trypomastigote and amastigote forms from infected Vero cells detected by Chagasic antibodies. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 47-54
  169. Souza, W. (2009). Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz** 104 Suppl 1, 89-100.
  170. Spohn, G. *et al.* (2007) A virus-like particle-based vaccine selectively targeting soluble TNF $\alpha$  protects from arthritis without inducing reactivation of latent tuberculosis. **Journal of Immunology**, v. 178, n. 11, p. 7450-7457.

171. Sungsuwan *et al.*, (2017) Evaluation of Virus-Like Particle-Based Tumor-Associated Carbohydrate Immunogen in a Mouse Tumor Model. **Methods Enzymol.**; 597:359-376
172. Tarleton, R.L. (2005) New approaches in vaccine development for parasitic infections. **Cell Microbiol** 7, 1379-1386.
173. Tarleton, R.L., Reithinger, R., Urbina, J.A., Kitron, U. & Gurtler, R.E. (2007) The challenges of Chagas Disease-- grim outlook or glimmer of hope. **PLoS Med** 4, e332.
174. Tearle *et al.*, (1996) The alpha-1,3-galactosyltransferase knockout mouse. Implications for xenotransplantation. **Transplantation**; 61(1):13-9
175. Teixeira, M. M., Gazzinelli, R. T. & Silva, J. S. (2002) Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 6, p. 262-265,.
176. Thall, a. D., malý, p. & lowe, J. B. (1995) Oocyte Gal alpha 1,3Gal epitopes implicated in sperm adhesion to the zona pellucida glycoprotein ZP3 are not required for fertilization in the mouse. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 37, p. 21437-21440.
177. Thorlacius-Ussing, L. *et al.* (2013) Proteomic analysis of tissue from  $\alpha$ 1,3galactosyltransferase knockout mice reveals that a wide variety of proteins and protein fragments change expression level. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. 1-10.
178. Toledo M, Tafuri W, Bahia MT, Tibayrenc M, Lana M, 2004. Genetic diversity and drug resistance in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. **Antimicrob Agents Chemother** 4: 11–22
179. Travassos, L.R. & Almeida, I.C. (1993) Carbohydrate immunity in American trypanosomiasis. **Springer Semin Immunopathol** 15, 183-204.
180. Turnock, D.C. & Ferguson, M.A.J. (2007) Sugar Nucleotide Pools of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, and *Leishmania major*. **Eukaryot Cell. Aug**; 6(8): 1450–1463
181. Unfer, R. C., Hellrung, D. & Link Jr, C. J. (2003) Immunity to the alpha(1,3)galactosyl epitope provides protection in mice challenged with colon cancer cells expressing alpha(1,3)galactosyl-transferase: a novel suicide gene for cancer gene therapy. **Cancer Research**, v. 63, n. 5, p. 987-993
182. Uphoff, C.C. & Drexler, H.G. (2005) Detection of mycoplasma contaminations. **Methods Mol Biol** 290, 13-23
183. Urbina, J.A. & Docampo, R. (2003) Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends Parasitol** 19, 495-501.
184. Urbina, J.A. (2010) Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. **Acta tropica** 115, 55-68.

185. Villanueva-Lizama L.E., Cruz-Chan J.V., Aguilar-Cetina A.d.C, Herrera-Sanchez L.F., Rodriguez-Perez J.M., Rosado-Vallado M.E., Ramirez-Sierra, M.J., Ortega-Lopez J, Jones K., Hotez P., Bottazzi M. E., Dumonteil E., (2018) *Trypanosoma cruzi* vaccine candidate antigens Tc24 and TSA-1 recall memory immune response associated with HLA-A and -B supertypes in Chagasic chronic patients from Mexico. **PLoS. Negl. Trop. Dis.** 12 e0006240.
186. Villavedra M. *et al* (2010) Characterisation of an immunodominant, high molecular weight glycoprotein on the surface of infectious Neoparamoeba spp., causative agent of amoebic gill disease (AGD) in Atlantic salmon. **Fish & Shellfish Immunology** 29; 946-955
187. Volpe, G. J., Moreira, H. T., Trad, H. S., Wu, K. C., Braggion-Santos, M. F., Santos, M. K., Schmidt, A. (2018). Left Ventricular Scar and Prognosis in Chronic Chagas Cardiomyopathy. **Journal of the American College of Cardiology**, 72(21), 2567–2576.
188. Warfield KL, Aman MJ. (2011). Advances in virus-like particle vaccines for filoviruses. **J Infect Dis**; 204Suppl 3:S1053–9.
189. WHO, 2002. Expert committee (2002). Control of Chagas disease. **World Health Organ Tech Rep** 905:109
190. WHO, 2013. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>. Acesso em 05 de março de 2018.
191. WHO, 2015. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Wkly Epidemiol Rec.** 90(6):33-44.
192. WHO, 2015a . Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected diseases 2015. Geneva
193. Wigglesworth, K. M. *et al.* (2011) Rapid recruitment and activation of macrophages by anti-Gal/ $\alpha$ -Gal liposome interaction accelerates wound healing. *Journal of Immunology*, v. 186, n. 7, p. 4422-4432.
194. Yilmaz, B. *et al.* (2014) Gut microbiota elicits a protective immune response against malaria transmission. **Cell**, v. 159, n. 6, p. 1277-1289.
195. Yin *et al* (2016) Chemical Synthesis of GM2 Glycans, Bioconjugation with Bacteriophage Q $\beta$ , and the Induction of Anticancer Antibodies. **ChemBiochem** ; 17(2): 174–180
196. Yoshida, N. (2006). Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias.** 78, 1, 87-11




197. Yoshida, N. (2008). *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity, **Parasitol, Int**, 57, 105-109.
198. Zhang, X. *et al.*, (2015) Lessons learned from successful human vaccines: Delineating key epitopes by dissecting the capsid proteins. **Human Vaccines & Immunotherapeutics** 11:5, 1277—1292.
199. Zinkernagel RM, Ehl S, Aichele P, Oehen S, Kundig T, Hengartner H. (1997). Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. **Immunol Rev**;156:199–209.

*Anexos*

## 9 ANEXOS

### 9.1 Considerações éticas na experimentação animal

Todas as atividades de pesquisas envolvendo modelos animais foram conduzidas de acordo com princípios éticos de boas práticas em experimentação animal, sendo que o projeto foi aprovado previamente pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, conforme certificado pelo Protocolo nº 255/2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**CERTIFICADO**  
Certificamos que o Protocolo nº. 255 / 2013, relativo ao projeto intitulado "Avaliação dos Camundongos  $\alpha$ 1,3galactosyltransferase Knockout (GalT-KO), como Eficientes Modelos Experimentais na Doença de Chagas", que tem como responsável Alexandre Ferreira Marques, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 15/04/2014. Este certificado espira-se em 15/04/2019.

**CERTIFICATE**  
We hereby certify that the Protocol nº. 255 / 2013, related to the Project entitled "LYTIC ANTI-GAL ANTIBODIES PROTECT  $\alpha$ 1,3-GALACTOSYLTRANSFERASE KNOCKOUT MICE AGAINST Trypanosoma cruzi.", under the supervision of Alexandre Ferreira Marques, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 15/04/2014. This certificates expires in 15/04/2019.

Jacqueline Isaura Alvarez Leite  
Coordenador(a) da CEUA/UFMG  
Belo Horizonte, 15/04/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG  
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

## 9.2 Artigo publicado como Co-Autora:

Brito, C. R. N. et al. (2016) Virus-like particle display of the  $\alpha$ -Gal epitope for the diagnostic assessment of Chagas disease. *ACS Infectious Diseases*, v. 2, n. 12, p. 917-922

### Virus-like Particle Display of the $\alpha$ -Gal Epitope for the Diagnostic Assessment of Chagas Disease

Carlos Ramon Nascimento Brito,<sup>†</sup> Craig S. McKay,<sup>§</sup> Maíra Araújo Azevedo,<sup>†</sup> Luíza Costa Brandão Santos,<sup>†</sup> Ana Paula Venuto,<sup>†</sup> Daniela Ferreira Nunes,<sup>†</sup> Daniella Alchaar D'Ávila,<sup>†</sup> Gisele Macedo Rodrigues da Cunha,<sup>†</sup> Igor Correia Almeida,<sup>‡</sup> Ricardo Tostes Gazzinelli,<sup>†</sup> Lucia Maria Cunha Galvão,<sup>†</sup> Egler Chiari,<sup>†</sup> Carlos A. Sanhueza,<sup>§</sup> M. G. Finn,<sup>\*,§</sup> and Alexandre Ferreira Marques<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>‡</sup>Border Biomedical Research Center, Department of Biological Sciences, University of Texas at El Paso, El Paso, Texas 79912, United States

<sup>§</sup>School of Chemistry and Biochemistry, Georgia Institute of Technology, Atlanta, Georgia 30332, United States

#### Supporting Information



**ABSTRACT:** The  $\alpha$ -Gal antigen [Gal $\alpha$ (1,3)Gal $\beta$ (1,4)GlcNAc $\alpha$ ] is an immunodominant epitope displayed by infective trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. A virus-like particle displaying a high density of  $\alpha$ -Gal was found to be a superior reagent for the ELISA-based serological diagnosis of Chagas disease and the assessment of treatment effectiveness. A panel of sera from patients chronically infected with *T. cruzi*, both untreated and benznidazole-treated, was compared with sera from patients with leishmaniasis and from healthy donors. The nanoparticle- $\alpha$ -Gal construct allowed for perfect discrimination between Chagas patients and the others, avoiding false negative and false positive results obtained with current state-of-the-art reagents. As previously reported with purified  $\alpha$ -Gal-containing glycosylphosphatidylinositol-anchored mucins, the current study also showed concentrations of anti- $\alpha$ -Gal IgG to decrease substantially in patients receiving treatment with benznidazole, suggesting that the semiquantitative assessment of serum levels of this highly abundant type of antibody can report on disease status in individual patients.

**KEYWORDS:** Chagas disease, diagnosis, ELISA,  $\alpha$ -Gal, anti- $\alpha$ -Gal antibodies, treatment assessment, *Trypanosoma cruzi*

### 9.3 Artigo publicado como Co-Autora:

Araújo RN et al. (2016) *Amblyomma sculptum* tick saliva:  $\alpha$ -Gal identification, antibody response and possible association with red meat allergy in Brazil. *Int J Parasitol.*;46(3):213-220



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal for Parasitology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijpara](http://www.elsevier.com/locate/ijpara)



## *Amblyomma sculptum* tick saliva: $\alpha$ -Gal identification, antibody response and possible association with red meat allergy in Brazil



Ricardo Nascimento Araujo<sup>a</sup>, Paula Ferreira Franco<sup>a</sup>, Henrique Rodrigues<sup>a</sup>, Luiza C.B. Santos<sup>a</sup>, Craig S. McKay<sup>b</sup>, Carlos A. Sanhueza<sup>b</sup>, Carlos Ramon Nascimento Brito<sup>a</sup>, Maíra Araújo Azevedo<sup>a</sup>, Ana Paula Venuto<sup>a</sup>, Peter J. Cowan<sup>c,d</sup>, Igor C. Almeida<sup>e</sup>, M.G. Finn<sup>b</sup>, Alexandre F. Marques<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup>Georgia Institute of Technology, School of Chemistry and Biochemistry, Atlanta, GA, USA

<sup>c</sup>Immunology Research Centre, St. Vincent's Hospital, Fitzroy, Melbourne, VIC 3065, Australia

<sup>d</sup>Department of Medicine, University of Melbourne, Parkville, VIC 3052, Australia

<sup>e</sup>Border Biomedical Research Center, Department of Biological Sciences, University of Texas at El Paso, El Paso, TX 79912, USA

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 8 November 2015

Received in revised form 4 December 2015

Accepted 10 December 2015

Available online 23 January 2016

##### Keywords:

*Amblyomma sculptum*

Alpha-Gal

Tick saliva

IgE

Red meat allergy

#### ABSTRACT

The anaphylaxis response is frequently associated with food allergies, representing a significant public health hazard. Recently, exposure to tick bites and production of specific IgE against  $\alpha$ -galactosyl ( $\alpha$ -Gal)-containing epitopes has been correlated to red meat allergy. However, this association and the source of terminal, non-reducing  $\alpha$ -Gal-containing epitopes have not previously been established in Brazil. Here, we employed the  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase knockout mouse ( $\alpha$ 1,3-GalT-KO) model and bacteriophage Q $\beta$ -virus like particles (Q $\beta$ -VLPs) displaying Gal $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc (Gal $\alpha$ 3LN) epitopes to investigate the presence of  $\alpha$ -Gal-containing epitopes in the saliva of *Amblyomma sculptum*, a species of the *Amblyomma cajennense* complex, which represents the main tick that infests humans in Brazil. We confirmed that the  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase knockout animals produce significant levels of anti- $\alpha$ -Gal antibodies against the Gal $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc epitopes displayed on Q $\beta$ -virus like particles. The injection of *A. sculptum* saliva or exposure to feeding ticks was also found to induce both IgG and IgE anti- $\alpha$ -Gal antibodies in  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase knockout mice, thus indicating the presence of  $\alpha$ -Gal-containing epitopes in the tick saliva. The presence of  $\alpha$ -Gal-containing epitopes was confirmed by ELISA and immunoblotting following removal of terminal  $\alpha$ -Gal epitopes by  $\alpha$ -galactosidase treatment. These results suggest for the first known time that bites from the *A. sculptum* tick may be associated with the unknown etiology of allergic reactions to red meat in Brazil.

© 2016 Australian Society for Parasitology Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.