

U F *m* G

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

O papel do epítipo α -Gal (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R) no diagnóstico sorológico e na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*

CARLOS RAMON DO NASCIMENTO BRITO

Belo Horizonte/MG

2017

Carlos Ramon do Nascimento Brito

O papel do epítipo α -Gal (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R) no diagnóstico sorológico e na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Parasitologia.

Área de concentração: Protozoologia

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Ferreira Marques

Laboratório de Imunoproteoma e Biologia de Parasitos

Belo Horizonte/MG

2017

COLABORADORES

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG

Departamento de Parasitologia

Prof. Dr. Egler Chiari

Profa. Dra. Lúcia Galvão

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ

Centro de Pesquisas René Rachou

Prof. Dr. Ricardo Gazzinelli

GEORGIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY

School of Chemistry and Biochemistry

Dr. M. G. Finn

Dr. Carlos A. Sanhueza

Dr. Craig S. McKay

UNIVERSITY OF TEXAS AT EL PASO - UTEP

Department of Biological Sciences

Dr. Igor Almeida

Department of Chemistry

Dr. Katja Michael

SUPORTE FINANCEIRO

Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM

Aos meus pais, Carlito e Raimunda.
Aos meus irmãos, Rodrigo, Rayssa e Rayanne.
Aos meus sobrinhos, Pedro, Letícia, Davi e Lorena.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela onipresença e onipotência em minha vida, e a Maria Santíssima, mãe intercessora e porta do céu;

Ao meu orientador e mentor intelectual, Prof. Dr. Alexandre Ferreira Marques, pelo exemplo de cientista e ser humano, e por sempre apoiar-me e acreditar na minha capacidade;

A todos que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da UFMG, em especial às sempre atenciosas Sumara e Sibebe;

Ao Departamento de Parasitologia, agradecendo a todos os professores e funcionários que contribuíram para minha formação;

Às agências de fomento CNPq e FAPESAM, por viabilizarem a realização desse projeto;

À Universidade Federal do Amazonas, especificamente aos amigos do Instituto de Saúde e Biotecnologia;

Aos amigos do Laboratório de Imunoproteoma e Biologia de Parasitos – Maíra Azevedo, Gisele Macedo, Ana Paula Venuto, Luíza Costa – pela amizade e incentivo;

Aos meus amigos do Dr. Almeida's Lab, em especial a Dr. Igor Almeida, que me recebeu de braços abertos em seu laboratório, assim como a Susana Portillo, minha irmã americana, e a todos os amigos que conquistei na UTEP;

Aos amigos do Lableish, minha primeira casa na UFMG, por todo o acolhimento e amizade;

Ao Laboratório de Doença de Chagas da UFMG, minha segunda casa, na pessoa dos Profs. Dr. Egler Chiari e Dra. Lúcia Galvão, a quem agradeço pela colaboração e orientações durante este doutorado; assim como a Daniela Nunes, uma amiga muito querida, e a Afonso, que além de me ensinar muito, se tornou um grande amigo;

A Andressa Noronha, uma irmã que Deus tentou me dar no mestrado, eu não percebi, e Ele mandou novamente no doutorado (para minha sorte); uma pessoa singular, sem meio termo; íntegra. Por ela só tenho um sentimento: amor;

A Fernando Brandão, pelo companheirismo, paciência, por me proporcionar paz quando eu dela precisava, e por ser uma pessoa tão incrível;

Aos amigos da UFMG, que merecem uma frase individual, mas pela objetividade dos agradecimentos serão apenas citados aqui, porém guardados para sempre no coração – Denise Nogueira, Elis Batista, Maíra Azevedo e Tiago Nascimento, não esquecendo de prestar uma homenagem ao meu amigo Kleber Fortes (*in memoriam*);

A minha turma de mestrado da UFMG, a eterna turma do mamão;

Aos amigos do Colégio Menino Deus, que sempre torceram por mim e vibraram a cada conquista alcançada;

A Leandro Alves e David Paula, estendendo às suas famílias, por todo o acolhimento;

Às amigas: Ana Paula Venuto, muito querida e sedimentada pra sempre em meu coração; Elaine Matias, minha companheira de café da manhã e de longas e boas conversas; Ivana Rocha, minha amiga bela por fora e por dentro; Jordanna Celeste, uma grande companheira (vou sentir mesmo sua falta); Luíza Costa, a novinha mais competente e dedicada; e Thallyta Maria Vieira, uma pessoa cativante pelo jeito de ser;

Aos meus irmãos Latinos Angel Rojas e Yuppiel Martínez. Dividir a residência multicultural com vocês me ensinou a ser um ser humano melhor;

Aos irmãos que a vida me deixou escolher: Alexandre Monte, a quem tenho um amor que ultrapassa sentimentos de amizade e se iguala a sentimentos fraternos; a Fábio Spínola e Jean Castelo, amigos pra todas as horas, para o que der e vier;

Aos meus irmãos Rodrigo, Rayssa e Rayanne, aos meus sobrinhos Pedro, Letícia, Davi e Lorena, e aos meus cunhados Cleideanny Costa e Paulo Marcelino; vocês são minha fortaleza;

A Goretti Santos (Tia Gueca), minha tia, madrinha, professora, colega, amiga e segunda mãe, uma grande incentivadora do meu processo de formação acadêmica, a quem amo e sou grato do fundo do coração, assim como ao meu amado Tio Josemar;

A todos os avós, tios e primos das Famílias Brito e Nascimento Teixeira;

A Carlito Carlos de Brito, painho, e a Raimunda Teixeira do Nascimento Brito, mainha, que não receberá um *in memoriam* após o nome, pois não há ninguém mais vivo que ela em meu coração. A vocês, meus pais, não escreverei frase alguma, pois não há palavras que consigam descrever o quanto sou grato; qualquer frase ou expressão ficará vazia, incompleta, e não transmitirá nem de perto o que sinto por vocês;

Por fim, a todos aqueles que estiveram presentes durante a realização e conclusão deste doutorado;

A todos vocês, meu sincero muito obrigado.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

Martin Luther King

RESUMO

O protozoário *Trypanosoma cruzi* apresenta uma superfície celular abundante em glicoconjugados imunogênicos que contém o epítipo α -Gal, responsável pela produção de elevados níveis de anticorpos específicos anti- α -Gal, excelentes alvos para o diagnóstico sorológico em indivíduos chagásicos. Nesse sentido, as plataformas Albumina Sérica Bovina (BSA) e Q β *virus-like particles* (Q β -VLP), que aumentam o número do epítipo α -Gal exposto, foram avaliadas como ferramentas para o diagnóstico sorológico da infecção pelo *T. cruzi* na fase crônica. Para isso, aproximadamente 22 unidades do epítipo α -Gal foram acopladas à BSA, e a reatividade dos anticorpos anti- α -Gal purificados de indivíduos chagásicos foi 230 vezes maior quando comparada àqueles purificados de indivíduos não chagásicos. Da mesma forma, o pool de soros de indivíduos chagásicos apresentou uma reatividade aproximadamente 20 vezes maior que o pool de soros de indivíduos não chagásicos. A outra plataforma utilizada, na qual 540 unidades de α -Gal foram acopladas ao Q β -VLP foi testada frente a soros de indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, não infectados ou com leishmaniose visceral. Os resultados evidenciaram uma excelente discriminação entre indivíduos chagásicos e não chagásicos, independente da parasitemia, grau de cardiopatia chagásica crônica e idade, assim como ausência de reatividade cruzada. Além disso, os níveis de IgG anti- α -Gal diminuíram, com o passar do tempo, em pacientes que receberam tratamento com benznidazol, sugerindo que a avaliação dos níveis séricos deste anticorpo pode fornecer informações importantes sobre a evolução da doença. Estes resultados indicam que o α -Gal acoplado à BSA ou ao Q β -VLP poderia ser um potencial candidato para diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*. Sendo α -Gal altamente imunogênico, e não produzido em células ou tecidos de humanos, foi levantada a hipótese deste epítipo ser utilizado como partícula vacinal. Com isso, avaliamos, na outra parte deste trabalho, camundongos que não expressam o epítipo α -Gal em seus tecidos como modelos experimentais na infecção pelo *T. cruzi*. Esses camundongos foram mais eficientes em controlar a infecção, e a elevada produção de anticorpos líticos anti- α -Gal pode ser um dos mecanismos responsáveis por essa proteção, assim como pela maior sobrevivência encontrada quando estes animais foram desafiados com uma dose letal de tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*.

Palavras chave: Doença de Chagas, diagnóstico, ELISA, epítipo α -Gal, anticorpos anti- α -Gal, *virus-like particles*, BSA, camundongos α 1,3galactosiltransferase knockout.

ABSTRACT

The protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* has a cell surface covered by immunogenic glycoconjugates expressing the α -Gal epitope, which triggers high levels of protective anti- α -Gal antibodies in infected individuals, representing excellent targets for the serological diagnosis. The use of bovine serum albumin (BSA) and Q β virus-like particle (Q β -VLP) platforms, which increase the number of displayed α -Gal epitope, was evaluated as a tool for the serological diagnosis of *T. cruzi* infection in chronic phase. For this purpose, ~22 units of α -Gal epitope were coupled to BSA and this neoglycoprotein was used as antigen, showing that purified anti- α -Gal antibodies from chagasic patients were ~230-fold more reactive than purified anti- α -Gal antibodies from healthy individuals. Similarly, the pooled sera from chagasic patients were recognized ~20-fold more strongly than pooled sera from healthy individuals. On the other platform used, 540 molecules of the α -Gal epitope were coupled to Q β -VLP and this antigen was tested against a panel of sera from patients chronically infected with *T. cruzi*, both untreated and benznidazole-treated, and compared with sera from patients with leishmaniasis and from healthy donors. The results showed excellent discrimination between chagasic and non-chagasic patients, regardless of parasitemia, degree of chronic chagasic cardiopathy and age, as well as the absence of cross-reactivity. Moreover, the anti- α -Gal IgG levels decreased substantially in patients receiving treatment with benznidazole, suggesting that the assessment of serum levels of this highly abundant type of antibody can report on disease status in individual patients. Taken together, these results indicate that α -Gal coupled to BSA or Q β -VLP could be a potential diagnostic candidate for *T. cruzi* infection. Since α -Gal is highly immunogenic and human cells or tissues are not able to produce it, it was hypothesized that this epitope could be used as a vaccine. Therefore, the last part of this work aimed to evaluate mice that do not express the α -Gal epitope in their tissues as experimental models in *T. cruzi* infection. These mice were more efficient at controlling the infection, showing a more organized immune response, and the high levels of lytic anti- α -Gal antibodies may be responsible by this protection, as well as by the greater survival found when these animals were challenged with a lethal dose of *T. cruzi* trypomastigotes (Y strain).

Keywords: Chagas disease, diagnosis, ELISA, α -Gal epitope, anti- α -Gal antibodies, virus-like particles, BSA, α 1,3galactosyltransferase knockout mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> . (Adaptado de RASSI JR, RASSI & MARIN-NETO, 2010)	3
Figura 2: Estrutura química do epítipo α -Gal (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc α -R). (Adaptado de SCHOCKER et al., 2016)	12
Figura 3. Síntese do epítipo α -Gal (marcado por retângulos com linhas tracejadas) em glicoproteínas (A) e em glicolipídios (B), e a ligação de anticorpos anti- α -Gal. (GALILI, 2015)	12
 CAPÍTULO 1: Avaliação da imunogenicidade de neoglicoproteínas contendo Galα1-3Galβ1-4GlcNAcα-, Galβ1-4GlcNAcα- e GlcNAcα- no contexto da doença de Chagas.	
Figura 1. Estrutura química dos carboidratos Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc α (1), Gal β 1-4GlcNAc α (2), GlcNAc α (3) e GlcNAc β (4) apresentando o grupo tiol (-SH). (SCHOCKER et al., 2016)	28
Figura 2. Representação esquemática da conjugação dos carboidratos 1-4 (figura 1) ao BSA e geração das neoglicoproteínas. a: Tris(2-carboxietil)fosfina, tampão fostato pH 7,2 e BSA ativado por maleimida. (SCHOCKER et al., 2016)	28
Figura 3. Espectrometria de massa MALDI-TOF das neoglicoproteínas Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc α -BSA (A), Gal β 1-4GlcNAc α -BSA (B), GlcNAc α -BSA (C) e GlcNAc β -BSA (D), mostrando o número médio de carboidratos acoplados por molécula de BSA. (SCHOCKER et al., 2016)	29
Figura 4. Reatividade de um pool de soros humanos chagásicos (ChHSP) e não chagásicos (NHSP) frente a diferentes neoglicoproteínas. RLU: unidades relativas de luminescência. (SCHOCKER et al., 2016)	30
Figura 5. Reatividade de anticorpos anti- α -Gal de indivíduos chagásicos (Ch- α -Gal) e não chagásicos (NHS- α -Gal) frente a diferentes neoglicoproteínas. RLU: unidades relativas de luminescência. (SCHOCKER et al., 2016)	31
Figura 6. Reatividade do soro de camundongos α 1,3GT-KO frente à neoglicoproteína Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc α -BSA antes (barra branca) e após (barra preta) imunização com Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc α -BSA ou somente BSA. RLU: unidades relativas de luminescência. (SCHOCKER et al., 2016)	31

CAPÍTULO 2: Diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* utilizando o epítopo α -Gal acoplado ao Q β virus-like particle.

Figura 1. Fluxograma da procedência e distribuição das amostras por grupo e tratamento etiológico com benznidazol	37
Figura 2. Síntese das <i>virus-like particles</i> (VLP) Q β (α -Gal) ₅₄₀ e Q β (α -Glc) ₅₄₀	40
Figura 3. Antigenicidade de pool de soros de indivíduos chagásicos (ChP), não chagásicos (Não-ChP) e com leishmaniose visceral (LV) frente aos antígenos Q β (Glc) ₅₄₀ , Q β (α -Gal) ₅₄₀ , tGPI-mucina e EpEx	46
Figura 4. Antigenicidade de soros de indivíduos chagásicos (ChP), não chagásicos (Não-ChP) e com leishmaniose visceral (LV) frente aos antígenos EpEx (A), tGPI-mucina (B) e Q β (α -Gal) ₅₄₀ (C).....	47
Figura 5. Reatividade do soro de indivíduos infectados pelo <i>T. cruzi</i> e não tratados, classificados quanto à forma clínica (A), hemocultura (B) e idade (C).....	49
Figura 6. Reatividade frente ao antígeno Q β (α -Gal) ₅₄₀ do soro de indivíduos tratados e não tratados por benznidazol, para acompanhamento da produção de anticorpos anti- α -Gal	49
Figura 7. Gráfico de citometria de fluxo mostrando a população de células escolhidas (esquerda), a porcentagem de fluorescência de tripomastigotas não incubadas com MOA-FITC (meio) e após incubação com MOA-FITC (direita)	50

CAPÍTULO 3: Avaliação de camundongos α -1,3-galactosiltransferase *knockout* como modelos experimentais na infecção pelo *T. cruzi*.

Figura 1. Parasitemia (A), sobrevivência (B) e variação do peso (C) em camundongos C57BL/6 α 1,3GT-WT e α 1,3GT-KO não infectados e infectados pela cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i>	64
Figura 2. Reatividade do soro de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-WT e α 1,3GT-KO não infectados e infectados pela cepa Y de <i>T. cruzi</i> frente ao antígeno Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-BSA (V-Labs [®]), antes e após tratamento com a enzima α -Galactosidase	64
Figura 3. Produção de citocinas séricas em camundongos C57BL/6 α 1,3GT-WT e α 1,3GT-KO infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i>	66
Figura 4. Produção de citocinas cardíacas em camundongos C57BL/6 α 1,3GT-WT e α 1,3GT-KO infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i>	67
Figura 5. Percentual de lise de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura	

de células quando incubadas com diferentes concentrações de anticorpos IgG anti- α -Gal purificados de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO infectados pela cepa Y de <i>T. cruzi</i> ...	68
Figura 6. Quantidade de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> (cepa Y) encontradas no sobrenadante de cultura de células LLC-MK2 (A) e de células infectadas oito dias pós-infecção (B) após incubação ou não com 100 μ g de anticorpos IgG anti- α -Gal	69
Figura 7. Percentual de sobrevivência de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO infectados com 100.000 tripomastigotas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> , duas horas após imunização ou não com 25 μ g de anticorpos anti- α -Gal	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Informações clínico-laboratoriais e epidemiológicas de indivíduos provenientes de regiões endêmicas dos estados de Minas Gerais e Rio Grande do Norte, Brasil	39
Tabela 2 – Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia (ACC) para os antígenos EpEx, tGPI-mucina e Q β (α -Gal) ₅₄₀ frente a um painel de soros de indivíduos chagásicos (ChP), não chagásicos (Não-ChP) e com leishmaniose visceral (LV)	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acurácia
α-Gal	Epítopo Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R
α1,3GT	Enzima α -1,3-galactosiltransferase
α1,3GT-KO	Camundongo α 1,3GT <i>knockout</i>
α1,3GT-WT	Camundongo α 1,3GT selvagem
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (albumina sérica bovina)
BENEFIT	<i>Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis</i>
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i> (demanda bioquímica de oxigênio)
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CCC	Cardiopatia Chagásica Crônica
ChHSP	Pool de 10 soros de indivíduos chagásicos crônicos
ChP	Pool de 20 soros de indivíduos chagásicos crônicos
Ch-α-Gal	Anticorpos anti- α -Gal isolados de indivíduos chagásicos crônicos
CL-ELISA	ELISA de quimioluminescência
CTR/DIP	Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol dicloridrato
DC	Doença de Chagas
D.O.	Densidade óptica
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DPI	Dias pós-infecção
DTU	<i>Discrete Typing Unit</i> (unidades discretas de tipagem)
ECG	Eletrocardiograma
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (ácido etilenodiamino tetra-acético)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ensaio imunoenzimático)
EpEx	Extrato de epimastigotas
EUA	Estados Unidos da América
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GIPL	Glicoinositolfosfolipídio
Glc	Glicose

GPI	Glicofosfatidilinositol
HAI	Reação de Hemaglutinação Indireta
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (peroxidase de rábano)
IFN-γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina da classe A
IgE	Imunoglobulina da classe E
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
IL	Interleucina
KCl	Cloreto de potássio
KH₂PO₄	Fosfato de potássio monobásico
LIT	<i>Liver infusion triptose</i> (infusão de fígado e triptose)
LLC-MK2	Células renais de macaco rhesus
LPG	Lipofosfoglicano
LV	Leishmaniose visceral
MOA	Aglutinina de <i>Marasmius oreades</i>
NaCl	Cloreto de sódio
Na₂HPO₄	Fosfato de sódio dibásico
Não-ChP	Pool de 20 soros de indivíduos não chagásicos
NGP	Neoglicoproteínas
NHS-α-Gal	Anticorpos anti- α -Gal isolados de indivíduos não chagásicos
NHSP	Pool de 10 soros de indivíduos não chagásicos
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
OPD	<i>Ortho-phenylenediamine</i> (ortofenilenodiamina)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (tampão fosfato salino)
PBS/BSA	PBS contendo albumina sérica bovina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
Qβ	Bacteriófago Q β
Qβ-VLP	Bacteriófago Q β <i>virus like particle</i>
Qβ(α-Gal)₅₄₀	Q β <i>virus-like particle</i> com 540 unidades do epítopo α -Gal na superfície
Qβ(Glc)₅₄₀	Q β <i>virus-like particle</i> com 540 moléculas de glicose na superfície

qPCR	PCR quantitativa em tempo real
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RLU	Unidades relativas de luminescência
SFB	Soro Fetal Bovino
SPI	Semanas pós-infecção
TESA	<i>Trypomastigote Excreted-Secreted Antigen</i> (antígeno secretado e excretado de tripomastigotas)
TCT	Tripomastigotas derivadas de cultura de células de mamífero
tGPI-mucina	Mucinas de tripomastigotas ancoradas a GPI
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano – ácido clorídrico
UDP-Gal	Uridina difosfato galactose
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
UTEP	<i>University of Texas at El Paso</i>
VLP	<i>Virus-like Particle</i>
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> e doença de Chagas.....	1
1.2. Tratamento etiológico da doença de Chagas.....	5
1.3. Diagnóstico da infecção pelo <i>T. cruzi</i>	7
1.4. Mucinas da superfície do <i>T. cruzi</i>	10
1.5. O epítipo α -Gal.....	11
1.6. Anticorpos anti- α -Gal.....	14
1.7. Q β <i>virus-like particles</i>	16
1.8. O modelo experimental α 1,3GT knockout.....	18
2. JUSTIFICATIVA.....	21
3. OBJETIVO GERAL.....	23

CAPÍTULO 1: Avaliação da imunogenicidade de neoglicoproteínas contendo Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-, Gal β 1-4GlcNAc- e GlcNAc- no contexto da doença de Chagas

1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
2.1. ELISA de quimioluminescência (CL-ELISA).....	26
2.2. Espectrometria de massa.....	26
2.3. Protocolo de imunização.....	27
3. RESULTADOS.....	28
4. DISCUSSÃO.....	32
5. CONCLUSÕES.....	34

CAPÍTULO 2: Diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* utilizando o epítipo α -Gal acoplado ao Q β *virus-like particle*

1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
2.1. População de estudo.....	37
2.2. Preparo das Q β <i>virus-like particles</i> (Q β -VLP).....	38
2.3. Obtenção de tripomastigotas e preparação do extrato total de epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	40

2.4.	Purificação de mucinas de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	41
2.5.	Hemocultura.....	41
2.6.	ELISA.....	42
2.7.	Citometria de fluxo.....	43
2.8.	Análise estatística.....	43
3.	RESULTADOS	45
4.	DISCUSSÃO	51
5.	CONCLUSÕES	56

CAPÍTULO 3: Avaliação de camundongos α -1,3-galactosiltransferase *knockout* como modelos experimentais na infecção pelo *T. cruzi*

1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	58
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	59
2.1.	Camundongos e parasitos.....	59
2.2.	Parasitemia e taxa de sobrevivência.....	59
2.3.	Variação de peso dos camundongos.....	60
2.4.	ELISA de quimioluminescência (CL-ELISA).....	60
2.5.	Dosagem de citocinas.....	61
2.6.	Ensaio lítico.....	61
2.7.	Infecção de células LLC-MK2 tratadas ou não com anticorpos anti- α -Gal.	62
2.8.	Análise estatística.....	62
3.	RESULTADOS	63
3.1.	Resistência e susceptibilidade de camundongos α 1,3GT-WT e α 1,3GT-KO à infecção pelo <i>T. cruzi</i>	63
3.2.	Produção de anticorpos líticos anti- α -Gal em camundongos α 1,3GT-KO...	67
3.3.	Influência <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de anticorpos anti- α -Gal na infecção pelo <i>T. cruzi</i>	68
4.	DISCUSSÃO	70
5.	CONCLUSÕES	76

4.	PERSPECTIVAS	77
5.	PRODUÇÃO CIENTÍFICA	78
5.1.	Artigo publicado (autor).....	78

5.2.	Artigos publicados (coautor).....	78
5.3.	Artigo aceito (coautor).....	78
5.4.	Capítulo de livro em preparação (coautor).....	78
6.	REFERÊNCIAS.....	79
7.	ANEXOS.....	97
7.1.	Anexo 1 – Artigo publicado (coautor): SCHOCKER, N. S. et al. Synthesis of Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α -, Gal β (1,4)GlcNAc α - and GlcNAc-containing neoglycoproteins and their immunological evaluation in the context of Chagas disease. <i>Glycobiology</i> , v. 26, n. 1, p. 39-50, 2016.....	97
7.2.	Anexo 2 – Capa da revista, artigo publicado (autor) e material suplementar: BRITO, C. R. N. et al. Virus-like particle display of the α -Gal epitope for the diagnostic assessment of Chagas disease. <i>ACS Infectious Diseases</i> , v. 2, n. 12, p. 917-922, 2016.....	98
7.3.	Anexo 3 - Aprovação do projeto de pesquisa pelo CEUA – UFMG.....	99

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

Mais de 100 anos após sua descoberta, e apesar de sua enorme carga econômica e social, a doença de Chagas (DC) continua sendo uma grande ameaça em vários países da América Latina e um emergente problema de saúde global (BALOUZ, AGÜERO & BUSCAGLIA, 2017). Atualmente, a DC encontra-se entre as 17 infecções parasitárias que fazem parte das doenças tropicais negligenciadas segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2015a). Essas doenças afetam pessoas que vivem com baixa renda, principalmente nos países em desenvolvimento, causando grandes problemas físicos, econômicos e de saúde nos pacientes e suas comunidades (WHO, 2013).

A DC, também conhecida como tripanossomíase americana, é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909), taxonomicamente pertencente ao reino Protozoa, filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma*. É uma infecção potencialmente fatal, de caráter crônico e de difícil manejo e tratamento, apresentando importante carga de morbidade, incapacidade e mortalidade nos países da América Latina (OPAS, 2006), com aproximadamente sete mil mortes a cada ano por complicações decorrentes da infecção (WHO, 2015a).

Estima-se que aproximadamente seis a sete milhões de indivíduos estão infectados pelo *T. cruzi* no mundo (WHO, 2017), 5,7 milhões somente na América Latina, com aproximadamente 30.000 novos casos anualmente devido à transmissão vetorial, e 70 milhões de indivíduos em risco de infecção em áreas endêmicas (WHO, 2015b).

Embora a incidência de novas infecções tenha diminuído no Brasil e em outros países devido à urbanização e melhoria das condições de vida (WHO, 2013), a DC continua sendo um problema de saúde pública relevante na América Latina, mostrando diferentes padrões regionais do ponto de vista epidemiológico. Os desafios são ampliados pelo fato de mais 80% dos indivíduos afetados pela DC não terem acesso ao diagnóstico e ao tratamento, evidenciando o alto impacto da morbidade, mortalidade e custo social desta doença (DIAS et al., 2016).

Atualmente, o risco de adquirir a DC não está restrito à América Latina, uma vez que a doença é considerada um problema emergente nos Estados Unidos (EUA) e na Europa, devido ao grande número de pessoas assintomáticas infectadas provenientes de áreas

endêmicas (BERN & MONTGOMERY, 2009). Dados recentes estimam aproximadamente 238.000 pessoas infectadas pelo *T. cruzi* nos EUA (MANNE-GOEHLER et al., 2016), com 28 casos documentados de transmissão vetorial autóctone no período de 1955 a 2015 (BERN et al., 2011; CANTEY et al., 2012; GARCIA et al., 2015).

O *T. cruzi* é transmitido para seres humanos pelas fezes e urina do vetor contaminadas com formas tripomastigotas metacíclicas. Outras possíveis formas de contaminação envolvem transfusão sanguínea, transplante de órgãos, infecção congênita, alimentos contaminados e acidentes de laboratório (BARRET, 2003; RASSI JR, RASSI & MARIN-NETO, 2010).

O tripanossomatídeo *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida complexo, que envolve diferentes estágios morfológicos (**Figura 1**). Dessa forma, a adaptação às diversas condições físico-químicas encontradas representa um importante mecanismo de sobrevivência desse parasito (NOGUEIRA et al., 2015). Durante o seu ciclo de desenvolvimento, o *T. cruzi* encontra condições ambientais bastante diferentes e enfrenta as respostas imunológicas dos hospedeiros. A resposta adaptativa a tais desafios resulta na transmissão bem sucedida do parasito e está interligada com seu próprio processo de diferenciação, uma vez que alguns fatores, como pH e estresse nutricional, desencadeiam a transição de um estágio de desenvolvimento para outro (JIMENEZ, 2014). Dessa forma, a coevolução entre o *T. cruzi* e seus hospedeiros promove uma estratégia interessante para o desenvolvimento e manutenção do parasitismo (NOGUEIRA et al., 2015).

A infecção humana inicia quando formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi*, presentes nas fezes do triatomíneo (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), invadem a circulação sanguínea do hospedeiro através de uma porta de entrada, como a causada pela picada do inseto ou mesmo uma mucosa intacta (TYLER & ENGMAN, 2001).

As tripomastigotas entram nas células hospedeiras por dois mecanismos, os quais envolvem uma interação prévia com os lisossomos das células hospedeiras. O primeiro mecanismo é mediado por uma fusão direta de lisossomos com a membrana plasmática no local de adesão do *T. cruzi*, processo que gradualmente dá origem ao vacúolo parasitóforo (TARDIEUX et al., 1992). O segundo mecanismo não é mediado pela fusão dos lisossomos, e envolve a invaginação da membrana plasmática, sem a participação do citoesqueleto de actina das células hospedeiras. Vacúolos parasitóforos formados por este mecanismo inicialmente contêm marcadores de membrana plasmática, porém rapidamente observa-se a fusão com lisossomos. Assim, ambos os mecanismos utilizados pelo *T. cruzi* para entrar em células

com vacúolos parasitóforos derivados de membranas plasmáticas neutraliza este processo de saída (ANDRADE & ANDREWS, 2004).

As tripomastigotas metacíclicas podem invadir macrófagos, fibroblastos e células epiteliais no local da inoculação e são inicialmente contidas em um vacúolo parasitóforo endocítico transitório (JIMENEZ, 2014). Após a invasão de uma variedade de células nucleadas, tripomastigotas metacíclicas se transformam em amastigotas intracelulares, que proliferam por uma série de divisões binárias e, finalmente, se diferenciam em tripomastigotas. Estas formas são liberadas para a matriz extracelular e, em seguida, para a corrente sanguínea ou linfa, para infectar outras células e tecidos (TYLER & ENGMAN, 2001; MINNING et al. 2009).

Para uma infecção ser bem-sucedida, as tripomastigotas metacíclicas, ao invadirem os macrófagos, devem sobreviver às condições oxidativas particularmente rigorosas encontradas dentro do vacúolo parasitóforo. Esse estresse oxidativo também contribui para a variabilidade genética do *T. cruzi*, característica essencial para um parasito intracelular com capacidade de infectar diferentes hospedeiros e tipos celulares (MACHADO-SILVA et al., 2016).

Eventualmente, tripomastigotas liberadas na corrente sanguínea são captadas pelo inseto vetor durante o repasto sanguíneo, iniciando um novo ciclo (TYLER & ENGMAN, 2001). Imediatamente após a ingestão, fatores presentes no intestino médio anterior seriam responsáveis por uma redução significativa da população de tripomastigotas ingeridas, levando a uma diminuição na população de parasitos. As tripomastigotas sobreviventes se transformam em formas intermediárias, que se diferenciam em epimastigotas no intestino médio posterior (FERREIRA et al., 2016). À medida que as epimastigotas atingem a extremidade posterior do intestino, elas se ligam à parede do reto e convertem-se em tripomastigotas metacíclicas infectantes e não replicativas (MINNING et al. 2009). No intestino posterior e no reto, as tripomastigotas metacíclicas livres se misturam com a urina e as fezes, e são liberadas pela defecação durante o ciclo de alimentação seguinte (JIMENEZ, 2014).

A DC inicia com uma breve fase aguda, caracterizada por elevada parasitemia e vários sintomas clínicos não específicos, que incluem febre, mal estar, inchaço dos gânglios linfáticos e hepatoesplenomegalia (GOLGHER & GAZZINELLI, 2004), assim como edema subcutâneo (localizado ou generalizado). No caso particular da transmissão vetorial, os sinais de porta de entrada do *T. cruzi* são o chagoma de inoculação, quando a infecção ocorre através da pele, e o Sinal de Romaña, quando acontece através das mucosas oculares (RASSI

JR, RASSI & MARIN-NETO, 2010). A doença pode ser mais grave em crianças menores de cinco anos de idade, idosos, imunossuprimidos ou indivíduos infectados com um grande número de parasitos, como ocorre em surtos de origem alimentar (transmissão oral). Nas pessoas vivendo com HIV, a meningoencefalite é a manifestação mais freqüente (WHO, 2015b).

Com a melhora da resposta imune do hospedeiro, a maioria dos parasitos é removida da corrente sanguínea e dos tecidos, ocorre o desaparecimento dos sintomas clínicos, e uma fase crônica é mantida, permanecendo por muitos anos ou mesmo por toda a vida na maioria dos indivíduos (GOLGHER & GAZZINELLI, 2004). As manifestações clínicas típicas da fase crônica estão relacionadas com o envolvimento patológico do coração, esôfago, cólon ou uma combinação destes (RASSI JR, RASSI & MARIN-NETO, 2010).

Durante esta fase, diferentes formas clínicas podem ser observadas: (i) a forma indeterminada ou assintomática - a forma mais frequente - é tipicamente encontrada imediatamente após a fase aguda e se estende por vários anos; (ii) a forma cardíaca, que ocorre em cerca de 30% dos pacientes, com distúrbios do sistema de condução elétrica do coração, arritmia, distúrbio do músculo cardíaco, insuficiência cardíaca e embolismos secundários; (iii) a forma digestiva, com lesões localizadas e aumento do esôfago e do cólon; e (iv) uma forma mista (cardíaca e digestiva) que afeta cerca de 10% dos pacientes (WHO, 2015b).

1.2. Tratamento etiológico da doença de Chagas

A DC representa atualmente um dos maiores desafios terapêuticos em medicina tropical, uma vez que o *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida complexo, envolvendo diferentes ambientes, e fatores inerentes ao parasito e aos hospedeiros vertebrados e invertebrados influenciam a evolução da doença. Esta complexidade também tem dificultado o desenvolvimento de uma vacina contra o *T. cruzi*. Um problema adicional consiste na perda progressiva do interesse e visibilidade da DC, que foi considerada controlada em algumas áreas endêmicas após a implementação de políticas de controle de vetores pelas organizações de saúde pública (BERMUDEZ et al., 2016).

O Benznidazol e o Nifurtimox, lançados no início da década de 1970, são os únicos fármacos aprovados para o tratamento humano no caso da infecção pelo *T. cruzi*. Ambos os compostos compartilham algumas características como melhor tolerância em crianças, maior efetividade na fase aguda da infecção, maior toxicidade em adultos e diferentes

suscetibilidades entre as diferentes DTUs de *T. cruzi* (RASSI JR, RASSI & REZENDE, 2012).

No Brasil, o benznidazol é a única droga utilizada atualmente para o tratamento específico da DC, uma vez que o nifurtimox não está disponível no mercado farmacêutico. As manifestações e efeitos adversos do benznidazol incluem dermatite por hipersensibilização, polineuropatia periférica, ageusia e depressão da medula óssea (DIAS et al., 2016). O nifurtimox era utilizado como alternativa em caso de intolerância ao benznidazol. No caso de falha terapêutica com uma das drogas, apesar de eventual resistência cruzada, a outra poderia ser utilizada (BRASIL, 2005).

De acordo com o segundo Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (2015), o tratamento na fase aguda da doença deve ser realizado em todos os casos, independentemente da via de transmissão do parasito, e o mais rápido possível. Na fase crônica, todas as crianças menores de 12 anos devem ser tratadas. Em adolescentes com idade entre 13-18 anos e adultos com infecção crônica recente (fase aguda ocorreu até 12 anos antes) o tratamento antiparasitário é geralmente recomendado. Para indivíduos com DC com idade entre 19-50 anos e sem infecção recente documentada, o tratamento antiparasitário deve ser considerado individualmente, seja na forma indeterminada ou determinada sem cardiopatia avançada. Em indivíduos com mais de 50 anos de idade e sem cardiopatia avançada, não existem estudos que justifiquem o tratamento antiparasitário. Em pacientes com DC na fase crônica com disfunção cardíaca grave, o tratamento antiparasitário não deve ser administrado, uma vez que não há evidência de benefício clínico (DIAS et al., 2016).

O BENEFIT (*Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*), maior estudo clínico realizado em pacientes com DC cardíaca crônica, mostrou que o tratamento com benznidazol, apesar de diminuir significativamente a detecção de parasitos circulantes, não conseguiu interromper o agravamento da doença em indivíduos com cardiopatia chagásica já estabelecida (MORILLO et al., 2015). No entanto, o tratamento contribuiu para diminuição da inflamação e para induzir o sistema imune a ativar mecanismos que favoreçam a eliminação do parasito.

Embora haja discordância quanto às taxas de cura do tratamento antiparasitário na DC, há evidências consistentes que demonstram sua utilidade tanto na fase aguda quanto crônica da doença e em todas as formas clínicas da infecção crônica, uma vez que as lesões orgânicas dependem exclusivamente (fase aguda) ou pelo menos em parte (fase crônica) da presença do parasito (DIAS et al., 2016).

A eficácia do tratamento antiparasitário na DC é verificada atualmente utilizando anticorpos anti-*T. cruzi* e/ou pela detecção de parasitos no sangue. Uma falha terapêutica é definida pela persistência do parasito, detectado por diferentes técnicas, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), enquanto o sucesso do tratamento seria medido pela ausência do parasito e redução dos títulos de anticorpos anti-*T. cruzi*. No entanto, uma redução nos títulos de anticorpos específicos leva frequentemente muitos anos, tornando a avaliação da eficácia terapêutica pouco sensível e bastante demorada (VIOTTI et al., 2014).

A avaliação do tratamento na fase crônica é, portanto, controversa e difícil de validar, porque não há critérios estabelecidos ou biomarcadores para verificar o sucesso do tratamento durante esta fase. Em um estudo clínico com adolescentes e crianças com DC crônica recente, tGPI-mucinas purificadas foram utilizadas com sucesso para avaliar a soroconversão de anticorpos anti- α -Gal líticos após tratamento com benznidazol em aproximadamente 85% dos pacientes e para correlacionar essas observações com a progressão da doença. Apesar de promissora, essa abordagem é limitada em parte às dificuldades técnicas de purificação de tGPI-mucinas em grande escala para uso rotineiro (ANDRADE et al, 2004; ANDRADE et al., 1996; ALMEIDA et al., 1994).

Dessa forma, novos tratamentos para a DC são urgentemente necessários, e os ensaios clínicos para novos candidatos a fármacos requerem um acompanhamento apropriado e o desenvolvimento de marcadores efetivos para a verificação da eficácia terapêutica e cura em pacientes chagásicos (VIOTTI et al., 2014).

1.3. Diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*

O diagnóstico da infecção na fase aguda da DC deve ser realizado pelo exame parasitológico direto do sangue ou liquor, uma técnica “padrão-ouro” nesta fase da doença. Outras técnicas utilizadas envolvem métodos de concentração (Strout, microhematócrito ou creme leucocitário), e lâmina corada de gota espessa ou esfregaço ou hemolcultura. O exame sorológico não é o mais indicado na fase aguda (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* inicia em média oito a dez semanas após o término da fase aguda, podendo se estender até o final da vida do indivíduo. Essa fase é caracterizada por uma baixa parasitemia, porém apresenta uma elevada produção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*, e por isso métodos de diagnóstico baseados na ligação antígeno-anticorpo são bastante utilizados para diagnóstico da infecção. As técnicas mais comumente utilizadas são o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), a reação de

imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio de hemaglutinação indireta (HAI) (RASSI JR, RASSI & REZENDE, 2012; BERN, 2015; BALOUZ, AGÜERO & BUSCAGLIA, 2017; SANTOS et al., 2017), e o diagnóstico da infecção é obtido quando no mínimo dois testes com princípios diferentes são reativos (WHO, 2002; DIAS et al., 2016). Atualmente também estão sendo empregados métodos sorológicos com o uso de quimioluminescência.

Apesar da DC ser uma importante causa de morbidade e mortalidade na América Latina, ainda não existe um método padrão-ouro para o diagnóstico da infecção na fase crônica, e há um número considerável de diagnósticos sorodiscordantes e inconclusivos, ou seja, que são reativos por um método e não reativos por outro, principalmente em indivíduos com baixas concentrações de anticorpos anti-*T. cruzi* (OTANI et al., 2009). O problema da sorodiscordância se estende atualmente também a países que não são endêmicos para a DC (MOURE et al., 2016), porém apresentam indivíduos infectados pelo *T. cruzi* devido aos movimentos migratórios populacionais, criando um novo cenário epidemiológico para a doença (COURA & VIÑAS, 2010).

A elevada variabilidade genética entre os isolados do *T. cruzi* (SOUTO et al., 1996; ZINGALES et al., 2009; ZINGALES et al., 2012; SANTOS et al., 2017), associada a fatores imunogenéticos do hospedeiro (LUQUETTI et al., 2003) poderia explicar parcialmente esses resultados falso-negativos. O consenso atual reconhece sete DTUs (*Discrete Typing Units*), TcI-TcVI e Tcbat (ZINGALES et al., 2012), mostrando que o *T. cruzi* não é uma população homogênea de parasitos, mas um conjunto de subpopulações que circulam nos ciclos doméstico e silvestre. Isolados de *T. cruzi* derivados de diferentes hospedeiros apresentam elevada heterogeneidade em parâmetros biológicos, como morfologia, composição antigênica, virulência, patogenicidade e sensibilidade aos fármacos, bem como características genéticas refletidas tanto no genoma nuclear como no cinetoplasto (ZINGALES et al., 1998).

Os primeiros testes sorológicos convencionais para DC dependiam fortemente da utilização de preparações antigênicas brutas derivadas de formas epimastigotas, que não são encontradas no hospedeiro vertebrado, e demonstravam problemas de reatividade cruzada com soros de indivíduos com leishmaniose, micoses ou algumas doenças autoimunes (ARAÚJO, 1986; SCHNAIDMAN et al., 1986; ALMEIDA et al., 1997). Em contraste, os testes utilizando antígenos semipurificados ou purificados de formas tripomastigotas derivadas de cultura de células de mamífero (TCT) apresentavam um desempenho muito melhor. A primeira geração de ensaios de ELISA utilizando tripomastigotas para diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* utilizou homogenatos total do parasito ou frações purificadas deste,

como, por exemplo, o antígeno excretado/secretado de tripomastigotas (TESA) (JAZÍN et al., 1991; UMEZAWA, SHIKANAI-YASUDA & STOLF, 1996), que apresentava sensibilidade e especificidade mais elevadas, assim como diminuição da reatividade cruzada com outros patógenos (SILVEIRA, UMEZAWA & LUQUETTI, 2001; ZARATE-BLADES et al., 2007; FURUCHÓ et al., 2008); ou as frações F2/3, mucinas de tripomastigotas altamente glicosiladas (ALMEIDA et al., 1994).

As mucinas ancoradas a glicosilfosfatidilinositol (GPI), purificadas a partir de formas TCT (tGPI-mucinas), têm sido altamente eficazes em ensaios baseados em ELISA para detecção da infecção pelo *T. cruzi*, incluindo análises de seguimento de pacientes tratados (ALMEIDA et al., 1997; De MARCHI et al., 2011; IZQUIERDO et al., 2013; ANDRADE et al., 1996; ANDRADE et al., 2004; PINAZO et al., 2016), porém a purificação destas glicoproteínas é demorada e trabalhosa, dificultando sua utilização no diagnóstico sorológico de rotina da infecção pelo *T. cruzi*.

O uso de antígenos recombinantes, peptídeos sintéticos (SILVEIRA, UMEZAWA & LUQUETTI, 2001; CABALLERO et al., 2007) e TESA (UMEZAWA, NASCIMENTO & STOLF, 2001; ZARATE-BLADES et al., 2007; FURUCHÓ et al., 2008) tem aumentado a sensibilidade e especificidade e diminuído as reações cruzadas com outros patógenos, como *Leishmania spp.* (MALCHIODI et al., 1994; CABALLERO et al., 2007) e *Trypanosoma rangeli* (SALDAÑA & SOUSA, 1996), um grande problema no diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*.

Recentemente, técnicas de diagnóstico baseadas em glicanos têm sido avaliadas para diversas doenças humanas (FERNÁNDEZ-TEJADA, CAÑADA & JIMÉNEZ-BARBERO, 2015). O uso potencial de carboidratos contendo glicotopos α -galactosil para diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* tem sido relatado, uma vez que alguns glicotopos imunodominantes da superfície do parasito poderiam ser utilizados como antígenos (ASHMUS et al., 2013). O epítopo α -Gal sintéticos ligado à albumina sérica bovina (BSA) foi utilizado para o reconhecimento de *pools* de soros de indivíduos infectados pelo *T. cruzi* (ASHMUS et al., 2013; SCHOCKER et al., 2016), mostrando resultados promissores, podendo ser explorados como antígenos para diagnóstico da infecção e seguimento de pacientes que receberam tratamento etiológico. O uso de *virus-like particles* (VLP) ligadas a glicotopos, como o epítopo α -Gal (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R), aumenta o número de epítopos expostos (BRITO et al., 2016), e pode ser uma importante ferramenta para otimização do diagnóstico, uma vez

que anticorpos anti- α -Gal são amplamente encontrados no soro de indivíduos chagásicos (AVILA, ROJAS & GALILI, 1989; ALMEIDA et al., 1991).

1.4. Mucinas da superfície do *T. cruzi*

Mucinas são as principais glicoproteínas da superfície do *T. cruzi* e seus resíduos de açúcar são capazes de interagir com as células de diferentes mamíferos (VILLALTA & KIERSZENBAUM, 1984). Os principais componentes da superfície de protozoários parasitos são ancorados à camada externa de fosfolípido da membrana plasmática principalmente por meio de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Dentre esses componentes encontram-se as glicoproteínas e os polissacarídeos, que se projetam para o lado externo da membrana a partir dos glicoinositolfosfolípidos (GIPL) e da camada de fosfolípidos basais, exibindo geralmente polimorfismos de sequência ou expressão específica para cada estágio do parasito (BUSCAGLIA et al., 2006). Os GIPLs foram os primeiros glicoconjugados do *T. cruzi* a serem purificados e completamente caracterizados (LEDERKREMER & AGUSTI, 2009).

Os glicoconjugados não são traduzidos diretamente do genoma, sendo produtos genômicos secundários. Eles são sintetizados no lúmen do complexo de Golgi e retículo endoplasmático, devido à ação de transportadores de membrana e glicosiltransferases (McCONVILLE et al., 2002) e estão envolvidos na ligação/invasão de células hospedeiras (ANDRADE & ANDREWS, 2005), na evasão da resposta imune do hospedeiro e na indução de anticorpos líticos protetores (ALMEIDA et al., 1994).

Em suas diferentes fases, a camada externa do *T. cruzi* é revestida por uma camada de glicoconjugados contendo glicanos altamente imunogênicos (ACOSTA-SERRANO et al., 2001). O principal componente dessa camada pertence à família das glicoproteínas do tipo mucina (ACOSTA-SERRANO et al., 2001; BUSCAGLIA et al., 2006). As mucinas de todos os estágios de *T. cruzi* são ancoradas por GPIs (LEDERKREMER & AGUSTI, 2009). Uma das principais características desta família é o revestimento protetor formado em torno da superfície do parasito, tornando-o mais resistente ao ataque de proteases e glicosidases e conferindo resistência à ação enzimática durante o seu desenvolvimento e crescimento (De PABLOS & OSUNA, 2012). Agindo na interface entre parasito, vetor e hospedeiro infectado, estas mucinas são ideais para cumprir um duplo propósito: proporcionar proteção contra os mecanismos de defesa derivados do vetor e/ou hospedeiro vertebrado, e garantir o direcionamento e a invasão de células ou tecidos (BUSCAGLIA et al., 2006). De fato, já foi

demonstrado que a ligação do *T. cruzi* à célula é mediada por carboidratos constituintes das mucinas (YOSHIDA et al., 1989; RUIZ et al., 1993).

As mucinas de amastigotas e tripomastigotas sanguíneas apresentam maior glicosilação e maior peso molecular (BUSCAGLIA et al., 2006) quando comparadas àquelas expressas pelas formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas, que apresentam menor peso molecular e uma estrutura oligossacarídica mais simples (PREVIATO et al., 1994), e são as principais moléculas aceptoras de resíduos α -Gal (LANTOS et al., 2016). Uma das características das mucinas ancoradas a GPI nas formas tripomastigotas de *T. cruzi* que as distinguem dos outros estágios do parasito é a presença de resíduos α -Gal terminais em O-glicanos ligados ao núcleo polipeptídico (ALMEIDA et al., 1994). Além disso, outra diferença marcante é que a presença do epítipo α -Gal nos oligossacarídeos O-ligados em mucinas está presente nas formas do parasito encontradas nos mamíferos, mas não naquelas localizadas no inseto vetor (LEDERKREMER & AGUSTI, 2009). Esse resíduo α -Gal, bastante conservado em tGPI-mucinas das formas tripomastigotas, é um antígeno imunodominante altamente expresso na superfície do parasito e estimula a produção de anticorpos anti- α -Gal (TRAVASSOS & ALMEIDA, 1993; ALMEIDA et al., 1994; SOARES et al., 2012; IZQUIERDO et al., 2013).

1.5. O epítipo α -Gal

O epítipo α -Gal é a denominação utilizada para o carboidrato com a fórmula molecular Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R (**Figura 2**). Esse glicotopo contém o dissacarídeo Gal α 1-3Gal β , que é fortemente reconhecido por anticorpos anti- α -Gal de indivíduos chagásicos, e reconhecido em menor grau por anticorpos anti- α -Gal de indivíduos não-chagásicos (ALMEIDA et al., 1994; ASHMUS et al., 2013), que são produzidos principalmente contra enterobactérias gram negativas da flora humana (GALILI et al., 1999).

O epítipo α -Gal é uma estrutura glicosídica única evolutivamente conservada não somente em mamíferos não primatas, como em macacos do novo mundo. Esse epítipo não está presente em macacos do velho mundo, símios e humanos, fazendo com que essas espécies produzam considerável quantidade de anticorpos anti- α -Gal (GALILI et al., 1987; GALILI et al., 1988a).

A observação de que esse epítipo está ausente em peixes, anfíbios, répteis e aves indica que a expressão dos genes envolvidos na formação dessa estrutura de carboidratos é um evento relativamente recente na evolução dos vertebrados. Este evento deve ter ocorrido

bastante previamente na evolução dos mamíferos, antes da divergência entre mamíferos placentários e marsupiais (estimado ter ocorrido aproximadamente 125 milhões de anos atrás), uma vez que o epítipo está presente em ambos os grupos de mamíferos (MACHER & GALILI, 2008).

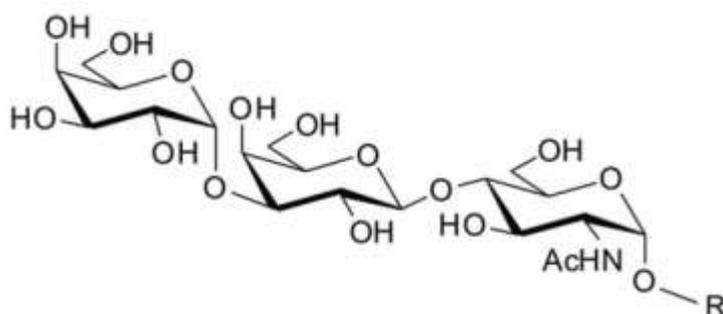


Figura 2: Estrutura química do epítipo α -Gal ($\text{Gal}\alpha 1\text{-}3\text{Gal}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc-R}$). (Adaptado de SCHOCKER et al., 2016).

O epítipo α -Gal é sintetizado pela enzima $\alpha 1,3$ -galactosiltransferase ($\alpha 1,3\text{GT}$) dentro do complexo de Golgi, que 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 ($\text{Gal}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc-R}$), suportado por uma glicoproteína ou um glicolípido (**Figura 3**) (BLANKEN & VAN den EIJNDEN, 1985).

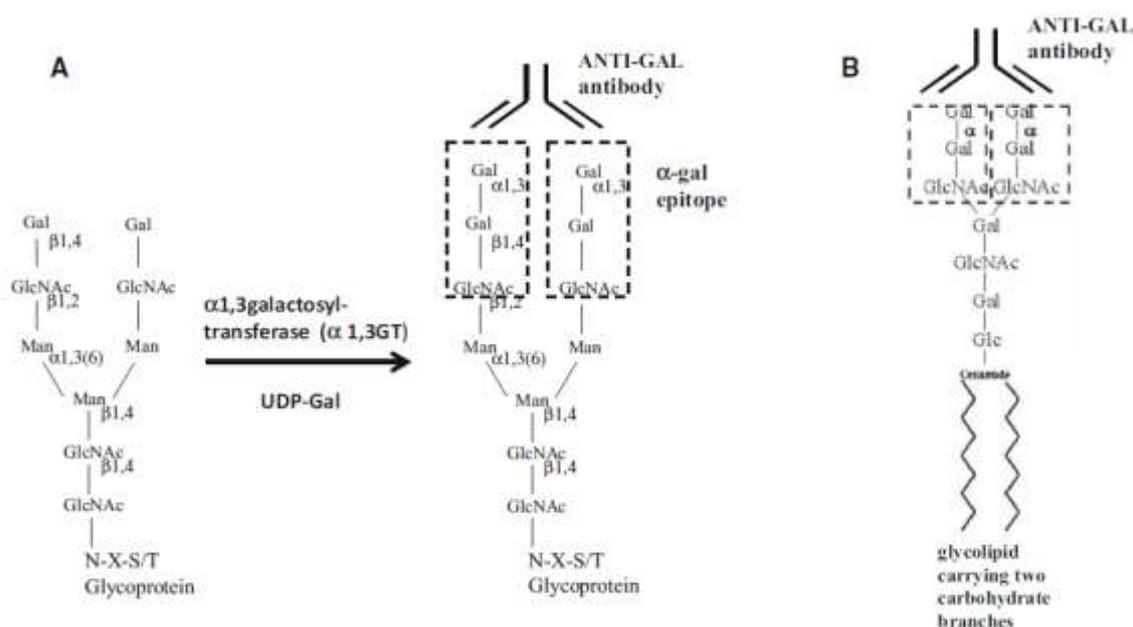


Figura 3. Síntese do epítipo α -Gal (marcado por retângulos com linhas tracejadas) em glicoproteínas (A) e em glicolípídios (B), e a ligação de anticorpos anti- α -Gal. (GALILI, 2015).

O genoma humano apresenta um gene para a enzima α 1,3-galactosiltransferase, embora parcialmente transcrito, porém mutações em primatas ancestrais causadas por alterações na janela de leitura (*frame-shift*) geraram códons de parada prematuros e truncamento da molécula enzimática, causando sua inativação (LANTÉRI et al., 2002).

A inativação da enzima α 1,3GT em primatas, ao longo de diferentes limites geográficos, sugere que pode ter havido uma pressão evolutiva exercida por um agente infeccioso (vírus, bactéria ou protozoário) que era endêmico aos continentes conectados do velho mundo. Esse agente provavelmente levou a um efeito nocivo em primatas que expressavam α -Gal nas suas células, sendo, portanto, tolerantes a esse epítipo. Dessa forma, a evolução desses primatas aconteceu em direção ao desenvolvimento da capacidade de produzir elevados títulos de anticorpos anti- α -Gal como um mecanismo de proteção, além da diminuição da expressão do epítipo α -Gal autólogo, eliminando a tolerância imunológica a este epítipo e assim permitindo a produção do anticorpo anti- α -Gal como meio de proteção contra algum patógeno que expressava epítipo α -Gal. Contudo, primatas que apresentavam uma elevada produção de anticorpos anti- α -Gal e ao mesmo tempo expressavam epítipo α -Gal nas suas células, teriam sido extintos como resultado de processo autoimune (GALILI et al., 1988a; MACHER & GALILI, 2008).

Uma causa alternativa para a inativação da enzima α 1,3GT pode ter sido o uso do epítipo α -Gal como um receptor celular pelo patógeno. Assim, a infecção endêmica de primatas do velho mundo, com uma cepa de bactéria produtora de uma toxina que se ligava ao α -Gal, poderia ter induzido uma pressão seletiva para a evolução dos primatas que não apresentavam o epítipo α -Gal, e assim, não eram suscetíveis aos efeitos da toxina (MACHER & GALILI, 2008).

Alguns protozoários expressam o epítipo α -Gal em sua superfície, como *T. cruzi* e *Leishmania spp.* (AVILA, ROJAS & GALILI, 1989), *Plasmodium falciparum* (RAMASAMY & RAJAKARUNA, 1997) e *Trypanosoma brucei* (PINGEL et al., 1999). O epítipo α -Gal é encontrado em pequena quantidade como antígenos internos em epimastigotas, porém é bastante abundante como antígenos de superfície de tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* (SOUTO-PADRON et al., 1994), o que explica a elevada produção de anticorpos anti- α -Gal nos indivíduos infectados por esse parasito.

1.6. Anticorpos anti- α -Gal

Anti- α -Gal é o anticorpo natural mais abundante em seres humanos, correspondendo a aproximadamente 1% da IgG circulante no soro, sendo ainda encontrado nos isotipos IgM, IgA (GALILI et al., 1984) e IgE (CHUNG et al., 2008). Cerca de 1% dos linfócitos B circulantes é capaz de produzir esse anticorpo, a maioria deles como fruto de uma constante estimulação antigênica por bactérias da flora intestinal normal (GALILI et al., 1993).

Todos os mamíferos que sintetizam o epítipo α -Gal são imunotolerantes a ele, e dessa forma não produzem anticorpos anti- α -Gal. É provável que a tolerância anti- α -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 α -Gal (GALILI, 2013). Nenhum outro evento evolutivo nos vertebrados envolveu a eliminação de uma molécula, como o epítipo α -Gal, nem o aparecimento subsequente de um anticorpo natural contra a molécula eliminada, nesse caso os anticorpos anti- α -Gal (GALILI, 2015).

Os anticorpos anti- α -Gal foram identificados e isolados com o intuito inicial de serem utilizados como uma potencial ferramenta para avaliação da resposta imune, uma vez que eles eram produzidos constantemente ao longo da vida, e desordens na sua produção poderiam indicar uma imunodeficiência humoral (GALILI et al., 1984; GALILI et al., 1988b).

Esses anticorpos reconhecem o resíduo terminal α -galactosil em glicoproteínas e glicolipídios, apresentando uma especificidade de ligação por terminais Gal α 1-3Gal, não se ligando, por exemplo, a terminais Gal α 1-4Gal (GALILI et al., 1985). A especificidade desse anticorpo está diretamente relacionada a todas as moléculas que compõem o epítipo α -Gal, uma vez que a remoção do grupamento N-acetil nesse trissacarídeo gera anticorpos com menor especificidade quando comparada ao epítipo que apresenta esse grupamento (ANRAKU et al., 2017).

A elevada especificidade desses anticorpos pelo epítipo α -Gal elimina o caráter polirreativo observado naturalmente em alguns anticorpos. Essa elevada especificidade pode ser consequência da ausência de cargas eletrostáticas nesse epítipo. Uma vez que nenhuma interação eletrostática (ligações iônicas) participa da ligação do epítipo α -Gal ao anticorpo anti- α -Gal, um encaixe preciso entre o anticorpo e o antígeno é necessário para permitir pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals, facilitando assim a interação (GALILI et al., 1993). Essa especificidade pode ainda ser devido à estabilidade

conformacional conferida pelo resíduo N-acetil na extremidade redutora do epítopo α -Gal. Embora esta mudança sutil em um único grupo funcional altere drasticamente o reconhecimento de anticorpos, os casos de discriminação de anticorpos entre estes dois grupos funcionais já foram documentados, destacando assim a importância dos efeitos estéricos e eletrônicos na determinação do reconhecimento de epítopos de anticorpos anti-carboidratos (ANRAKU et al., 2017).

A função fisiológica desse anticorpo parece estar envolvida na remoção de eritrócitos senescentes, assim como na atuação numa primeira linha de defesa contra agentes infecciosos (GALILI, 1993a). Na infecção pelo *T. cruzi* foi observado que a lise direta do parasito pelos anticorpos anti- α -Gal é um mecanismo de proteção na fase aguda da doença (GAZZINELLI et al., 1991), contudo os parasitos conseguem escapar desse mecanismo após penetrarem nas células, se protegendo, dessa forma, da destruição via anticorpo lítico.

Alguns anticorpos que surgem em doenças infecciosas são estimulados por epítopos de carboidratos, presentes na superfície dos parasitos. Soros de indivíduos com leishmaniose cutânea americana e DC, e de macacos infectados pelo *T. cruzi* ou *Trypanosoma rhodesiense*, apresentam forte ligação a carboidratos presentes em glicoproteínas (especificamente lamininas) de camundongos. Esses anticorpos reconhecem o grupo terminal Gal α 1-3Gal, um epítopo comum presente na laminina (TOWBIN et al., 1987).

Na infecção pelo *T. cruzi*, os títulos de anticorpos anti- α -Gal estão aumentados quando comparados com indivíduos não infectados (ALMEIDA et al., 1991; GAZZINELLI et al., 1991; GONZÁLEZ et al., 1995). De fato, o epítopo α -Gal está presente na membrana de tripomastigotas de *T. cruzi* (BRETANA et al., 1992), em GIPLs e lipofosfoglicanos (LPGs) (AVILA, ROJAS & GALILI, 1989; ALMEIDA et al., 1994). A liberação de vesículas pode ser um mecanismo adicional pelo qual o *T. cruzi* apresenta sistematicamente seus antígenos ao hospedeiro (TORRECILHAS et al., 2009), uma vez que, durante o seu ciclo de vida, tripomastigotas de *T. cruzi* são capazes de liberar vesículas extracelularmente, contendo glicoproteínas da superfície do parasito (SOARES et al., 2012). Além disso, já foi mostrado em cultura de células VERO que formas intracelulares continuam a produzir e liberar GIPLs e LPGs contendo o epítopo α -Gal, podendo estimular o sistema imune para uma produção contínua de elevados títulos de anticorpos anti- α -Gal em pacientes chagásicos (SOUTO-PADRON et al., 1994).

1.7. Q β virus-like particles

Virus-like particles (VLP) são frequentemente estruturas icosaédricas compostas de subunidades de proteínas, com estabilidade robusta, tamanho e forma monodispersos, composição proteica geneticamente controlada e altos graus de polivalência (RHEE et al., 2012). Essas partículas não são infecciosas, e essa característica é alcançada ou pela remoção do material genético e recuperação somente das proteínas estruturais do capsídeo, ou pela expressão das proteínas estruturais de forma heteróloga (SCHWARZ & DOUGLAS, 2015).

As VLP são imunógenos eficientes devido à elevada densidade de epítomos na sua superfície, podendo ser reconhecidas e apresentadas ao sistema imunológico por células apresentadoras de antígenos, estimulando assim a imunidade humoral e celular de forma eficaz através de vias semelhantes às dos patógenos originais (KELLER et al., 2010). Elas podem ainda ser utilizadas como veículos para a exposição de determinantes antigênicos na sua superfície (KOZLOVSKA et al., 1993), uma vez que resíduos de aminoácidos reativos na superfície das VLP podem ser quimicamente endereçados para receberem diferentes moléculas (PATEL & SWARTZ, 2011; HOVLID et al., 2014). Dessa forma, as VLP proporcionam alternativas promissoras para o desenvolvimento de agentes terapêuticos ou de diagnóstico, apresentando antígenos e estimulando o sistema imunológico, oferecendo as vantagens de uma partícula viral, mas sem o risco da doença (SCHWARZ & DOUGLAS, 2015).

Outro aspecto importante das VLP é que elas podem ser altamente estáveis frente a variações de temperatura, pH e composição do solvente (ASHCROFT et al., 2005; JOHNSON et al., 2007), sendo assim bastante interessantes para modificações químicas, mantendo muitas características vantajosas de suas moléculas biológicas originais (FIEDLER et al., 2012).

Dentre as VLP mais comumente utilizadas, destacam-se as proteínas de revestimento do bacteriófago Q β , um membro da família Leviviridae, por suas aplicações na área da química e da medicina. O bacteriófago Q β é formado por um capsídeo icosaédrico de 180 subunidades de proteína, e essas proteínas de superfície formam um dímero interdigitado com domínios α -hélice sobre regiões adjacentes de folha β (BROWN, FIEDLER & FINN, 2009; FIEDLER et al., 2012).

O Q β -VLP tem sido utilizado com segurança em alguns ensaios clínicos em humanos. Uma vacina contra a dependência de nicotina utilizou o Q β ligado covalentemente à nicotina (MAURER et al., 2005). A vacinação com Q β -Nicotina levou à indução de anticorpos

específicos anti-nicotina. Quando o indivíduo fuma, os anticorpos previamente gerados se ligam à nicotina no sangue e inibem a sua passagem para o cérebro, uma vez que os anticorpos normalmente não podem atravessar a barreira hematoencefálica. Esta vacina foi eficaz para cessar o tabagismo em indivíduos que apresentavam os níveis de anticorpos anti-nicotina suficientemente elevados (MAURER & BACHMANN, 2006; CORNUZ et al., 2008). Outra vacina utilizou o Q β ligado a um peptídeo derivado da angiotensina II, sendo eficiente em reduzir a pressão arterial sanguínea, evidenciando um potencial uso como tratamento anti-hipertensivo (AMBÜHL et al., 2007). O Q β foi utilizado também como plataforma para uma vacina contra o vírus H1N1, e era ligado ao domínio globular da hemaglutinina desse vírus, sendo capaz de induzir uma forte resposta de produção de anticorpos anti-H1N1 (LOW et al., 2014).

Outros exemplos do uso do Q β envolvem estudos realizados em modelos murinos, como vacinas utilizando Q β -TNF- α para prevenção de doenças inflamatórias (SPOHN et al., 2007), Q β -peptídeo inibitório gástrico para tratamento da obesidade (FULURIJA et al., 2008) e Q β -interleucina 1 α para tratamento da aterosclerose (TISSOT et al., 2013). Além disso, o uso do Q β como plataforma para a apresentação de antígenos de carboidratos associados a tumores também tem sido relatado (YIN et al., 2013).

No campo da Parasitologia, o Q β -VLP foi utilizado acoplado à proteína circunsporozoíta (CSP) de *Plasmodium falciparum*, buscando investigar se a imunogenicidade de CSP solúvel poderia ser aumentada pela apresentação numa VLP. Quando formulado com adjuvantes sem um agonista de TLR4, o Q β -CSP induziu a produção de títulos mais elevados de anticorpos específicos anti peptídeo NANP, de anticorpos citófilos de IgG2b/c e uma tendência para uma proteção mais elevada no desafio de parasitos transgênicos em comparação com CSP solúvel formulada no mesmo adjuvante (KHAN et al., 2015).

Um estudo realizado pelo nosso grupo utilizou o Q β -VLP exibindo 540 unidades do epítipo α -Gal para imunizar camundongos α 1,3GT knockout e verificar a produção de anticorpos anti- α -Gal do tipo IgG e IgE. A imunização levou a um aumento na produção de anticorpos anti- α -Gal, e quando esses camundongos foram expostos à saliva do carrapato *Amblyomma sculptum*, uma espécie do complexo *Amblyomma cajennense*, quer seja pela injeção de saliva ou pela exposição à picada dos carrapatos, houve uma indução na produção de anticorpos anti- α -Gal do tipo IgE, sugerindo que a picada desse carrapato poderia estar associada a reações alérgicas à carne vermelha no Brasil (ARAÚJO et al., 2016).

Outro estudo objetivando avaliar a eficácia de proteção de uma vacina contra *Plasmodium vivax* utilizou quatro diferentes plataformas, dentre elas o Q β ligado à proteína de passagem celular de *P. vivax* para oocinetos e esporozoítos (PvCelTOS), e apesar da indução de anticorpos anti-PvCelTOS e respostas de células T CD8⁺ específicas de PvCelTOS, baixos níveis de proteção no desafio com esporozoítos gerados em *Plasmodium berghei* expressando PvCelTOS (Pb-PvCelTOS) foram obtidos utilizando qualquer estratégia de imunização (ALVES et al., 2017).

1.8. O modelo experimental α 1,3GT knockout

A interação entre o epítipo α -Gal e o anticorpo natural anti- α -Gal é considerado o principal obstáculo para o transplante de órgãos entre humanos e outras espécies (xenotransplante) (GALILI, 1993b). O modelo experimental mais relevante clinicamente para examinar a rejeição de um xenoenxerto mediada por anticorpos anti- α -Gal é o transplante de tecidos ou órgãos porcinos em primatas superiores do velho mundo (COWAN & d'APICE, 2003), os quais, assim como os seres humanos, não possuem a enzima α 1,3GT, responsável pela síntese do epítipo α -Gal, e conseqüentemente desenvolvendo anticorpos anti- α -Gal (GALILI et al., 1988a). No entanto, as questões éticas e o custo elevado envolvendo experimentação em primatas levaram os pesquisadores a buscar um modelo experimental menor para esse tipo de estudo (COWAN & d'APICE, 2003).

Camundongos α 1,3GT Knockout (α 1,3GT-KO) foram gerados inicialmente por meio da interrupção do gene da enzima α 1,3GT em células estaminais embrionárias, com o intuito de verificar o papel de oligossacarídeos contendo Gal α 1-3Gal na fertilização desses animais. Os camundongos α 1,3GT-KO foram tão férteis quanto os camundongos α 1,3GT selvagens (α 1,3GT-WT), indicando que o epítipo Gal α 1-3Gal não é essencial para a fecundação nesta espécie, e gerando um modelo animal pequeno e ideal para estudar abordagens que possam diminuir a rejeição hiperaguda dependente de anticorpos anti- α -Gal nos transplantes de órgãos (THALL, MALÝ & LOWE, 1995). Outro grupo gerou camundongos α 1,3GT-KO pela interrupção do exon nove do gene da enzima α 1,3GT, que codifica para um domínio catalítico dessa enzima. Os camundongos nasceram viáveis e férteis, e o desenvolvimento de cataratas corticais dentro de quatro a seis semanas de nascimento foi a única anormalidade patológica detectada (TEARLE et al., 1996). Alguns anos depois, foi observado que esses animais apresentavam tolerância à glicose e sensibilidade à insulina diminuídas (DAHL et al., 2006), e

que a deleção deste gene afeta a expressão de diferentes proteínas com funções variadas (THORLACIUS-USSING et al., 2013).

Além do uso extensivo dos camundongos $\alpha 1,3\text{GT-KO}$ para estudos envolvendo transplantes de órgãos, esses animais têm sido utilizados 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, 2009) e em estudos de aceleração da cicatrização de queimaduras e feridas (GALILI, WIGGLESWORTH & ABDEL-MOTAL, 2010; WIGGLESWORTH et al., 2011; GALILI, 2017).

No campo da parasitologia, os animais $\alpha 1,3\text{GT-KO}$ foram utilizados como modelo experimental para verificar se a produção de anticorpos anti- α -Gal em resposta à exposição à bactéria *Escherichia coli* contribuiria para uma defesa natural contra o *Plasmodium* spp., sendo evidenciada uma resposta imunológica protetora desencadeada pela microbiota intestinal contra a transmissão deste parasito (YILMAZ et al., 2014). Mais recentemente, a exposição à picada do carrapato *A. sculptum* e a produção de IgE específica anti- α -Gal tem sido relacionada à alergia à carne vermelha no Brasil. Nesse estudo, camundongos $\alpha 1,3\text{GT-KO}$ e o Q β -VLP apresentando o epítipo α -Gal foram utilizados para investigar a presença de epítopos contendo α -Gal na saliva de *A. sculptum*, que representa o principal carrapato que infesta seres humanos no Brasil (ARAÚJO et al., 2016).

Na infecção pelo *T. cruzi*, anticorpos líticos direcionados a tripomastigotas, apresentando especificidade para o terminal α -Gal, são um dos principais mecanismos de proteção contra o parasito (ALMEIDA et al., 1991; GAZZINELLI et al., 1991). No entanto, 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. Estudos da resposta imune humoral utilizando camundongos $\alpha 1,3\text{GT-WT}$ podem não esclarecer a participação deste que seria um dos principais mecanismos protetores contra o parasito, evidenciado pela produção abundante de anticorpos anti- α -Gal (ALMEIDA et al., 1991; GAZZINELLI et al., 1991; GONZÁLEZ et al., 1995; LaTEMPLE & GALILI, 1998; CHIANG et al., 2000).

Considerando, portanto, a enorme importância funcional e diagnóstica dos carboidratos na biologia do *T. cruzi* (LEDERKREMER & AGUSTI, 2009), pode-se formular a hipótese de que uma vez que o epítipo α -Gal é altamente imunogênico para o homem e estimula a produção de anticorpos específicos anti- α -Gal, a utilização de uma plataforma que

exponha uma elevada quantidade deste epítopo torna-se uma excelente ferramenta para o diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* e avaliação da eficácia terapêutica.

2. JUSTIFICATIVA

Apesar dos esforços realizados na América Latina para tentar controlar a transmissão pelo *T. cruzi*, a DC continua sendo uma grande ameaça em alguns países e um emergente problema de saúde global. Uma das principais questões relativas ao controle da DC está relacionada ao diagnóstico laboratorial. Sem instrumentos e métodos de diagnóstico acessíveis e eficazes, os indivíduos infectados podem não ser corretamente identificados e, por conseguinte, tratados. Mesmo tratados, o sucesso do tratamento pode não ser eficientemente avaliado, pela inexistência de ferramentas adequadas (BALOUZ, AGÜERO & BUSCAGLIA, 2017).

Os métodos diagnósticos atuais são eficientes na detecção da maioria das infecções pelo *T. cruzi* em seres humanos. No entanto, ainda existem algumas situações clínicas e/ou epidemiológicas em que o seu desempenho é prejudicado. Esses testes são baseados em conjuntos limitados de antígenos parasitários, não refletindo toda a diversidade entre os diferentes isolados do *T. cruzi*. Embora tenham sido feitos esforços para identificar novos antígenos parasitários para diagnóstico sorológico, um teste ideal ainda é urgentemente necessário. A melhoria dos testes sorológicos permitiria uma melhor vigilância epidemiológica para a detecção precoce de casos vetoriais, congênitos e orais, bem como para a prevenção de casos transfusionais (DUMONTEIL & HERRERA, 2017).

Nesse contexto, o epítipo α -Gal, altamente expresso em tripomastigotas de *T. cruzi* e responsável pela produção de elevados níveis de anticorpos específicos anti- α -Gal em indivíduos chagásicos, representa um excelente alvo para o diagnóstico sorológico. Essa molécula está presente em todas as DTUs de *T. cruzi*, em diferentes quantidades, fazendo com que um ensaio de ELISA que utilize o α -Gal como antígeno seja provavelmente mais eficiente em detectar a infecção frente a soros de indivíduos infectados por diferentes isolados.

A forma como esse antígeno é apresentando, assim como a quantidade de moléculas expostas, pode interferir no reconhecimento pelos anticorpos anti- α -Gal específicos. A utilização de plataformas estáveis e de fácil obtenção, como a molécula de BSA, que apresenta um número elevado de locais de conjugação, ou o Q β -VLP, que pode ser utilizado para a apresentação de uma enorme quantidade do epítipo α -Gal, podem melhorar a captura de anticorpos e assim detectar mais eficientemente a infecção pelo *T. cruzi*, podendo ainda ser de grande utilidade para seguimento da eficácia terapêutica no tratamento com benznidazol.

Outro problema encontrado na DC é a ausência de uma vacina para prevenção e/ou tratamento da infecção. A maioria dos estudos sobre o estabelecimento e evolução da doença ou sobre vacinas utilizam modelos murinos que expressam α -Gal em suas células, podendo não retratar o modelo ideal de resposta imune desenvolvida por seres humanos frente à infecção pelo *T. cruzi*. A falta de um modelo animal que mimetize com maior eficiência a resposta imune humana contra o *T. cruzi* pode prolongar a busca por um tratamento eficiente da doença. É racional assumir que a tolerância desses modelos animais ao epítipo α -Gal não permita o esclarecimento da participação de anticorpos líticos anti- α -Gal na infecção, um dos principais mecanismos protetores contra o parasito (ALMEIDA et al., 1991).

Para contornar esse problema, a utilização de camundongos geneticamente deficientes, por interrupção da enzima α 1,3GT, pode contribuir com um modelo mais próximo aos seres humanos em relação à resposta imune (GALILI, 1991). Estes animais não expressam o epítipo α -Gal em suas células e tecidos, mimetizando os humanos na produção de anticorpos líticos anti- α -Gal durante a infecção pelo *T. cruzi*, podendo auxiliar para uma melhor compreensão da resposta imune e contribuir para o desenvolvimento de uma prevenção ou tratamento mais eficiente da DC.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o uso do epítipo α -Gal acoplado à BSA ou Q β -VLP no diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* e verificar a resposta de camundongos α 1,3GT-KO frente à infecção pelo *T. cruzi*.

A tese está dividida em três capítulos:

Capítulo 1: Avaliação da imunogenicidade de neoglicoproteínas contendo Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc α -, Gal β 1-4GlcNAc α - e GlcNAc- no contexto da doença de Chagas.

Capítulo 2: Diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* utilizando o epítipo α -Gal acoplado ao Q β *virus-like particle*.

Capítulo 3: Avaliação de camundongos α -1,3-galactosiltransferase knockout como modelos experimentais na infecção pelo *T. cruzi*.

CAPÍTULO 1

Avaliação da imunogenicidade de neoglicoproteínas contendo Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc α -, Gal β 1-4GlcNAc α - e GlcNAc- no contexto da doença de Chagas

Publicado (Anexo 1):

SCHOCKER, N. S. et al. Synthesis of Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α -, Gal β (1,4)GlcNAc α - and GlcNAc-containing neoglycoproteins and their immunological evaluation in the context of Chagas disease. *Glycobiology*, v. 26, n. 1, p. 39-50, 2016.

1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Verificar o uso da neoglicoproteína Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc α -BSA e suas versões truncadas Gal β 1-4GlcNAc α -BSA, GlcNAc α -BSA e GlcNAc β -BSA para diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*;
- 2- Avaliar a imunogenicidade da neoglicoproteína Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc α -BSA em camundongos α 1,3GT-KO.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A síntese das neoglicoproteínas (NGP) foi realizada pelo Dr. Nathaniel Schocker sob orientação da Dra. Katja Michael, do Departamento de Química da *University of Texas at El Paso* (UTEP). As análises de imunogenicidade das NGP foram realizadas no laboratório do Dr. Igor Almeida, no Departamento de Ciências Biológicas da UTEP.

2.1. ELISA de quimioluminescência (CL-ELISA)

Inicialmente, 12ng de cada NGP foram diluídos em tampão carbonato/bicarbonato 0,2M (pH 9,6), imobilizadas em microplacas MaxiSorp de 96 poços NUNC[®] (Thermo Fisher Scientific) e incubadas durante a noite a 4°C. Os sítios de ligação livre foram bloqueados com 200 µl/poço de BSA 1% em PBS 1X, pH 7,4 (PBS/BSA 1%). Foram adicionados 50µl de pool de soro humano chagásico e não chagásico (obtido de indivíduos do estado de Minas Gerais) como anticorpos primários, na diluição de 1/800, ou anticorpos anti- α -Gal purificados de indivíduos chagásicos e não chagásicos (1 µg/mL), de acordo com o protocolo de Almeida et al. (1991), diluídos em PBS/BSA 1% com Tween 20 a 0,05% (Promega) (PBS/BSA 1%/Tween 20 0,05%). Adicionou-se então 50µl de anticorpo de cabra anti-IgG humano biotilado (Thermo Fisher Scientific), na diluição de 1/10.000 em PBS/BSA 1%/Tween 20 0,05% como anticorpo secundário. Após essa etapa, foram adicionados 50µl da enzima HRP conjugada a neutravidina de alta sensibilidade (Thermo Fisher Scientific), diluída a 1/5.000 em PBS/BSA 1%/Tween 20 0,05%. Finalmente, a reação foi revelada adicionando 50µL de substrato quimioluminescente de peroxidase (*SuperSignal ELISA Pico Chemiluminescent Substrate* - Thermo Fisher Scientific), diluído 1/8 em tampão carbonato/bicarbonato 0,2 M, pH 9,6 com 0,1% de BSA. As unidades relativas de luminescência (RLU) para detecção do complexo antígeno-anticorpo foram obtidas usando um luminômetro Luminoskan (Thermo Fisher Scientific). Todas as incubações entre as etapas foram realizadas durante 1 hora a 37°C. As microplacas foram lavadas três vezes com PBS/Tween 20 0,05% entre todas as etapas, exceto antes do bloqueio, no qual somente o excesso do antígeno foi retirado.

2.2. Espectrometria de massa

A massa molecular das NGPs foi avaliada por espectrometria de massa MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*) no instrumento

Shimadzu Axima MALDI-TOF MS. Para cada 5µL de amostra foram adicionados 2,5µL da matriz (ácido sinapínico reconstituído com 1mL de acetonitrila:água (ACN:H₂O 2:1) com 0,1% de ácido trifluoroacético - TFA) e 1,5µL de ACN:H₂O (2:1) com 0,1% TFA. A proporção de amostra, matriz e ACN:H₂O 0,1% TFA foi de 5:2,5:1,5. Para análise no espectrômetro de massa, 0,5µL de amostra foi aplicada sobre a placa de platina e seca à temperatura ambiente. A padronização foi realizada utilizando o BSA ativado por maleimida (BSA-maleimida) isoladamente como amostra, e a razão massa/carga (m/z) foi comparada com a obtida nas NGP. O número médio de carboidratos conjugados por molécula de BSA foi então estimado pela diferença entre a razão m/z da NGP e do BSA-maleimida, dividida pela massa do carboidrato acoplado.

2.3. Protocolo de imunização

Grupos de cinco camundongos com fundo genético C57BL/6 e deficientes para a enzima α1,3GT foram imunizados subcutaneamente na região dorsal com 20µg de Galα1-3Galβ1-4GlcNAcα-BSA em 200µL de PBS/dose/imunização ou 20µg de BSA em 200µL de PBS/dose/imunização. Todos os animais foram imunizados quatro vezes com intervalos de sete dias e eutanaziados 14 dias após a última imunização. O sangue foi coletado por punção cardíaca e o soro foi separado por centrifugação a 2000 × g para análise por CL-ELISA. Todos os procedimentos animais foram realizados de acordo com os protocolos de animais vertebrados A-201211-1 e A-201411-1 e aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso Animal da UTEP.

3. RESULTADOS

O grupo tiol (-SH) presente nos compostos 1-4 (**Figura 1**) serviu como nucleófilo para conjugação ao BSA ativado por maleimida (BSA-maleimida) comercialmente disponível (Sigma-Aldrich) e produção das NGPs, em tampão aquoso pH 7,2, como mostrado na **figura 2**.

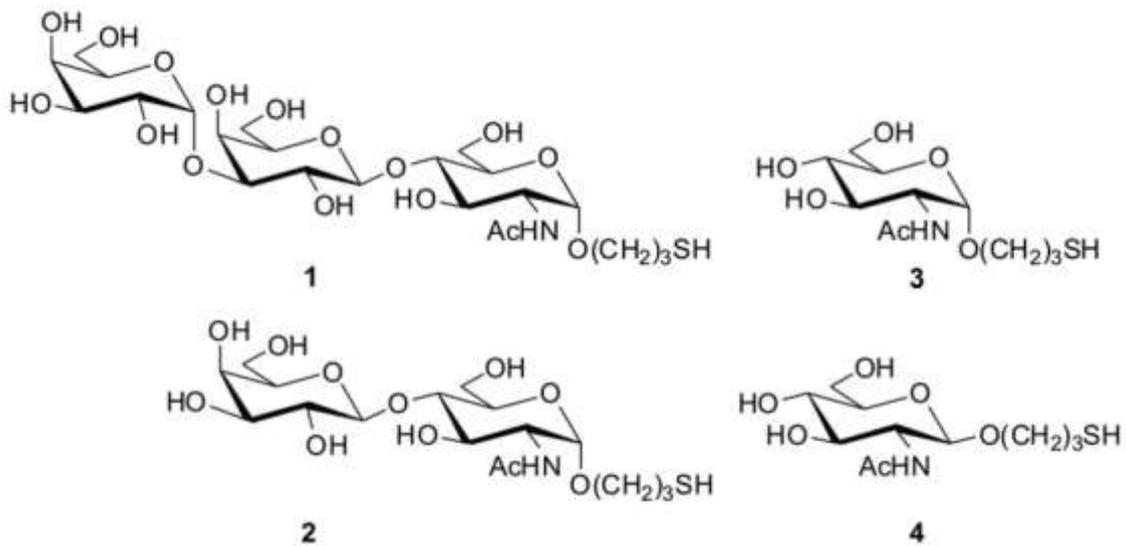


Figura 1. Estrutura química dos carboidratos Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc (1), Gal β 1-4GlcNAc (2), GlcNAc (3) e GlcNAc β (4) apresentando o grupo tiol (-SH). (SCHOCKER et al., 2016).

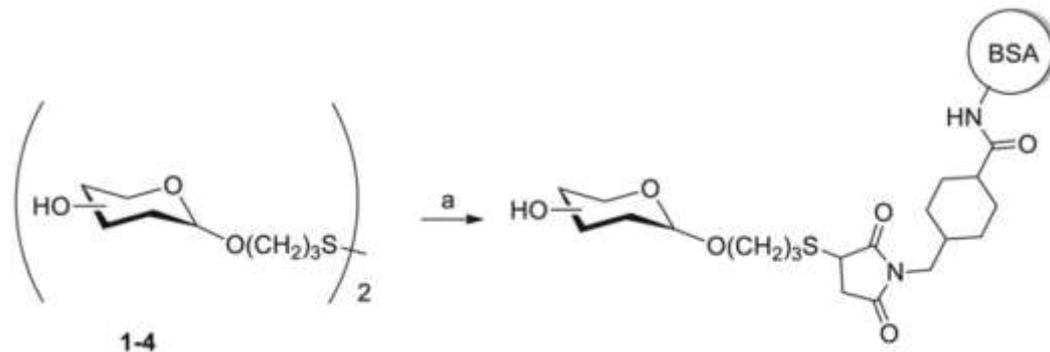


Figura 2. Representação esquemática da conjugação dos carboidratos 1-4 (figura 1) ao BSA e geração das neoglicoproteínas. a: Tris(2-carboxietil)fosfina, tampão fosfato pH 7,2 e BSA ativado por maleimida. (SCHOCKER et al., 2016).

Uma média de 22-23 unidades de Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc (**Figura 3A**), 23-24 unidades de Gal β 1-4GlcNAc (**Figura 3B**), 29 unidades de GlcNAc (**Figura 3C**) e 25 unidades de GlcNAc β (**Figura 3D**) foram acopladas por molécula de BSA.

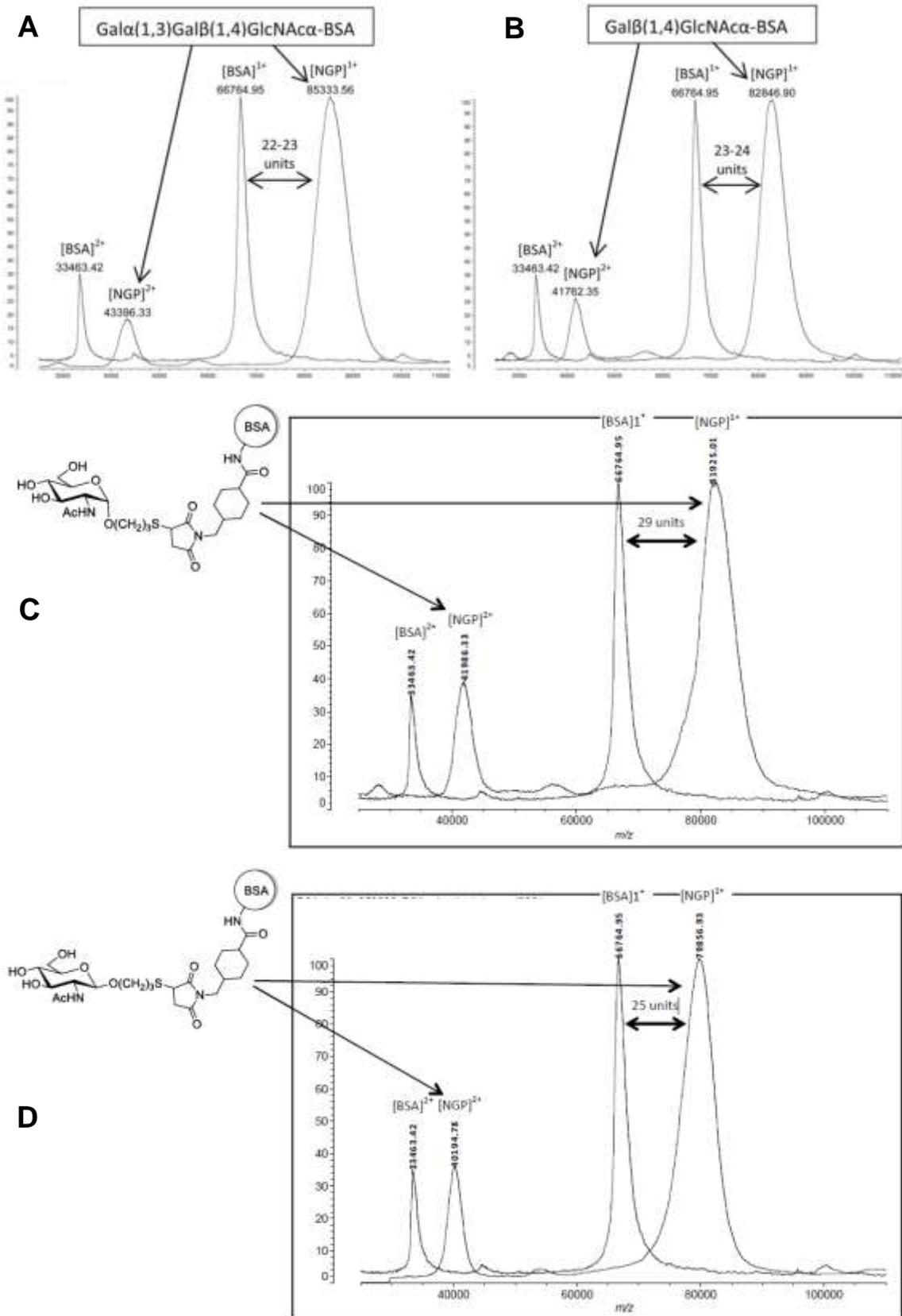


Figura 3. Espectrometria de massa MALDI-TOF das neoglicoproteínas Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc α -BSA (A), Gal β 1-4GlcNAc α -BSA (B), GlcNAc α -BSA (C) e GlcNAc β -BSA (D), mostrando o número médio de carboidratos acoplados por molécula de BSA. (SCHOCKER et al., 2016).

As quatro NGP produzidas, além de um BSA controle, em que os grupos maleimida foram bloqueados com cisteína (Cys-BSA), foram imobilizadas em placas Nunc Maxisorp® de 96 poços e as respostas de ligação antígeno-anticorpo foram avaliadas por meio de CL-ELISA (ALMEIDA et al., 1997), utilizando pools de dez soros de humanos chagásicos (ChHSP) e dez soros de humanos não chagásicos (NHSP), bem como anticorpos anti- α -Gal isolados de indivíduos chagásicos (Ch- α -Gal) e não chagásicos (NHS- α -Gal).

Como mostrado na **figura 4**, a NGP Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc α -BSA exibiu uma reatividade aproximadamente 20 vezes maior quando foram comparados os pools de soros de indivíduos chagásicos e não chagásicos, enquanto que as NGP Gal β 1-4GlcNAc α -BSA, GlcNAc α -BSA e GlcNAc β -BSA apresentaram uma reatividade bastante baixa para ambos os grupos. A molécula Cys-BSA provou ser um bom controle negativo, por exibir baixa reatividade.

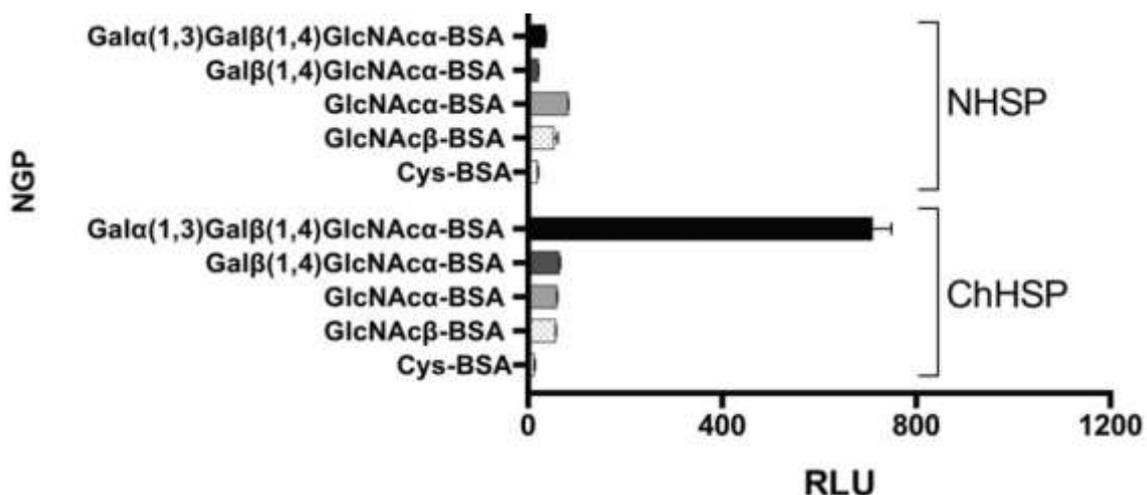


Figura 4. Reatividade de um pool de soros humanos chagásicos (ChHSP) e não chagásicos (NHSP) frente a diferentes neoglicoproteínas. RLU: unidades relativas de luminescência. (SCHOCKER et al., 2016).

A próxima etapa consistiu em analisar a reatividade de anticorpos Ch- α -Gal e NHS- α -Gal frente a essas NGP. Conforme ilustrado na **figura 5**, Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc α -BSA exibiu um diferencial de reatividade de aproximadamente 230 vezes entre anticorpos anti- α -Gal purificados de indivíduos Ch \times NHS, enquanto que as NGPs Gal β 1-4GlcNAc α -BSA, GlcNAc α -BSA e GlcNAc β -BSA não foram praticamente reconhecidas por esses anticorpos.

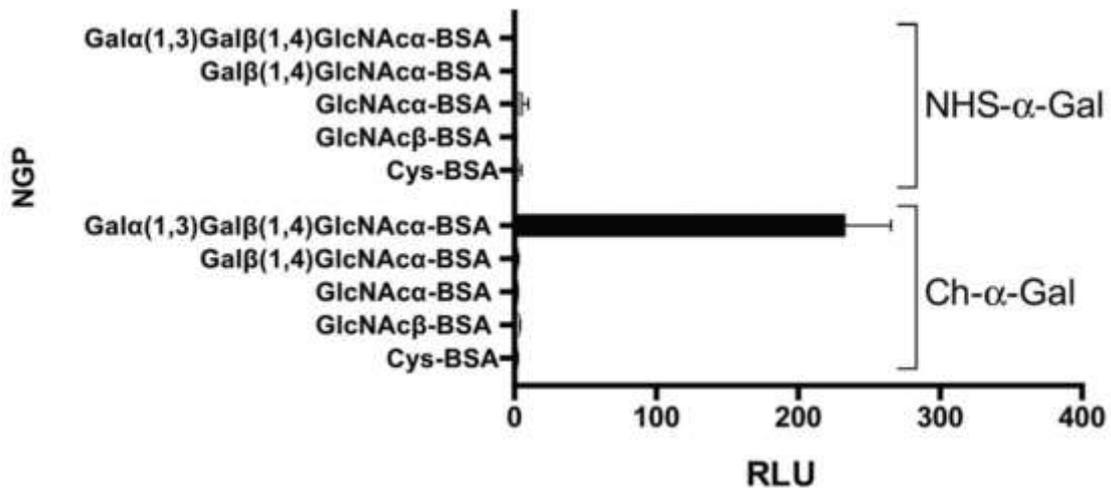


Figura 5. Reatividade de anticorpos anti- α -Gal de indivíduos chagásicos (Ch- α -Gal) e não chagásicos (NHS- α -Gal) frente a diferentes neoglicoproteínas. RLU: unidades relativas de luminescência. (SCHOCKER et al., 2016).

A resposta *in vivo* da produção de anticorpos anti- α -Gal após imunização com a NGP Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc α -BSA foi avaliada em camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO. Os camundongos imunizados com Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc α -BSA apresentaram uma produção de anticorpos 22 vezes maior após imunização em comparação com os níveis de anticorpos pré-imunização, enquanto aqueles imunizados somente com BSA apresentaram baixa reatividade, tanto antes quanto após a imunização (Figura 6).

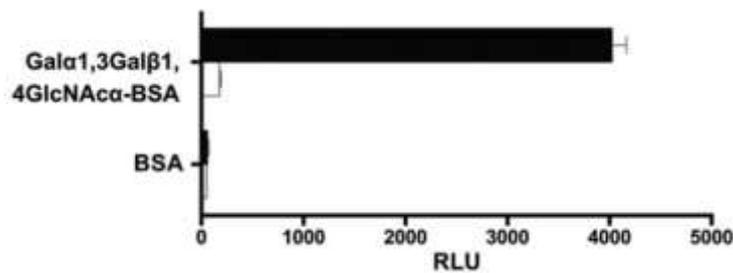


Figura 6. Reatividade do soro de camundongos α 1,3GT-KO frente à neoglicoproteína Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc α -BSA antes (barra branca) e após (barra preta) imunização com Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc α -BSA ou somente BSA. RLU: unidades relativas de luminescência. (SCHOCKER et al., 2016).

4. DISCUSSÃO

O protozoário *T. cruzi*, agente etiológico da DC, apresenta uma superfície celular recoberta por glicoconjugados imunogênicos (TRAVASSOS & ALMEIDA, 1993; ACOSTA-SERRANO et al., 2007). Um dos glicotopos imunodominantes, o trissacarídeo Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc α , é expresso em mucinas ancoradas com glicosilfosfatidilinositol das formas tripomastigotas de *T. cruzi* e desencadeia a produção de níveis elevados de anticorpos anti- α -Gal protetores em indivíduos infectados (ALMEIDA et al., 1991; ALMEIDA et al., 1994).

Já foi demonstrado que os anticorpos anti- α -Gal de indivíduos chagásicos reconhecem o dissacarídeo Gal α 1-3Gal β , que compreende os dois açúcares terminais do epítipo α -Gal, muito mais eficientemente do que o carboidrato Gal α isoladamente (ASHMUS et al., 2013). Dessa forma, para obter informações sobre a importância das outras estruturas que compõem esse epítipo no reconhecimento pelos anticorpos anti- α -Gal, foram criadas quatro NGP acopladas ao BSA, sendo uma formada pelo trissacarídeo que compõe o epítipo e mais três adicionais contendo Gal β 1-4GlcNAc α , GlcNAc α ou GlcNAc β . O BSA foi escolhido para a geração das NGP devido ao seu grande número de locais de conjugação por molécula, suas propriedades de solubilidade e sua adequação como proteína transportadora (MAKELA & SEPPALA, 1986) além de fornecer epítopos de células T para a imunização de camundongos (ATASSI et al., 1982), e da sua capacidade de fixar não covalentemente aos poços das microplacas.

A elevada reatividade observada para a NGP Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc α -BSA mostra que o resíduo Gal α terminal foi crucial para o reconhecimento por anticorpos anti- α -Gal de indivíduos chagásicos, uma vez que foi observada uma baixa reatividade frente às NGPs Gal β 1-4GlcNAc α -BSA, GlcNAc α -BSA e GlcNAc β -BSA, que não apresentam esse resíduo, apesar de serem glicotopos não próprios do ser humano. Anraku et al. (2017) demonstraram que a porção N-acetil também desempenha um papel fundamental na seletividade observada nesses anticorpos. A utilização de dois trissacarídeos contendo o resíduo α -Gal, um com a porção N-acetil (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc) e o outro sem (Gal α 1-3Gal β 1-4Glc), na imunização de camundongos α 1,3GT-KO, induziu a produção de títulos elevados de anticorpos IgG anti- α -Gal, no entanto essa resposta foi muito mais intensa para o trissacarídeo que apresentava a porção N-acetil.

Os resultados enfatizam ainda que a NGP Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc α -BSA pode ser utilizada como antígeno para o diagnóstico diferencial entre indivíduos infectados e

não infectados pelo *T. cruzi* ou como um teste confirmatório no caso da utilização de anticorpos anti- α -Gal purificados dos indivíduos a serem analisados. A inclusão de um pool de soro de indivíduos com leishmaniose visceral se faz necessária para verificar a possível existência de reatividade cruzada com esse antígeno. Uma desvantagem da utilização de anticorpos anti- α -Gal purificados para o diagnóstico sorológico seria a dificuldade inerente ao processo de obtenção desses anticorpos e o grande volume de amostra necessário.

Devido à elevada reatividade dos soros de indivíduos chagásicos frente à NGP Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc α -BSA, imunizações em camundongos α 1,3GT-KO foram realizadas com o intuito de verificar a imunogenicidade dessa NGP, e uma possível utilização para uma vacinação experimental profilática. Esse trissacarídeo foi altamente imunogênico no contexto da infecção pelo *T. cruzi*, verificado pela elevada produção de anticorpos específicos, indicando que além de ser um potencial candidato para diagnóstico, poderia ser também explorado como vacina ou uma potencial partícula para acompanhamento da eficácia do tratamento etiológico na DC.

5. CONCLUSÕES

- Os soros de indivíduos infectados pelo *T. cruzi* na fase crônica reconheceram Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc α -BSA mais fortemente do que indivíduos sem a infecção;
- A NGP Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc α -BSA foi reconhecida aproximadamente 230 vezes mais por anticorpos anti- α -Gal purificados de indivíduos chagásicos na fase crônica do que de indivíduos não chagásicos;
- O dissacarídeo Gal β 1-4GlcNAc α e os monossacarídeos GlcNAc α ou GlcNAc β conjugados com BSA são pouco reconhecidos por anticorpos anti- α -Gal purificados ou pelo soro de indivíduos chagásicos e não chagásicos, destacando a importância da porção Gal α terminal para o reconhecimento por estes anticorpos;
- A imunização com a NGP Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc α -BSA induziu a produção de elevados títulos de anticorpos anti- α -Gal em camundongos α 1,3GT-KO.

CAPÍTULO 2

Diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* utilizando o epítipo α -Gal acoplado ao Q β *virus-like particle*

Publicado (Anexo 2):

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

1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Validar o uso do antígeno $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$ para diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*, comparado aos antígenos $Q\beta(\text{Glc})_{540}$, tGPI-mucina e EpEx;
- 2- Investigar o desempenho do antígeno $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$ em relação à forma clínica da doença de Chagas, grau de cardiopatia chagásica crônica, hemocultura e idade de indivíduos infectados pelo *T. cruzi* e não tratados;
- 3- Comparar a reatividade do soro de indivíduos infectados pelo *T. cruzi* quanto à produção de anticorpos IgG anti- $\alpha\text{-Gal}$ após tratamento com benznidazol, utilizando o antígeno $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. População de estudo

Um painel de 161 amostras de soro de pacientes chagásicos (reativos por no mínimo dois testes com princípios diferentes) e indivíduos não chagásicos (não reativos por nenhum teste) e com leishmaniose visceral foi analisado. Um total de 157 soros foi proveniente do Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias (CTR/DIP), da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e quatro do Laboratório de Biologia de Parasitos e doença de Chagas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), todos obtidos de indivíduos residentes em área endêmica. Os indivíduos tratados foram submetidos ao tratamento específico com benznidazol a uma dose diária por via oral de 5mg/kg durante 60 dias. (**Figura 1**). O uso do soro humano foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, sob número de CAAE 0559.0.203.000-11/2012.

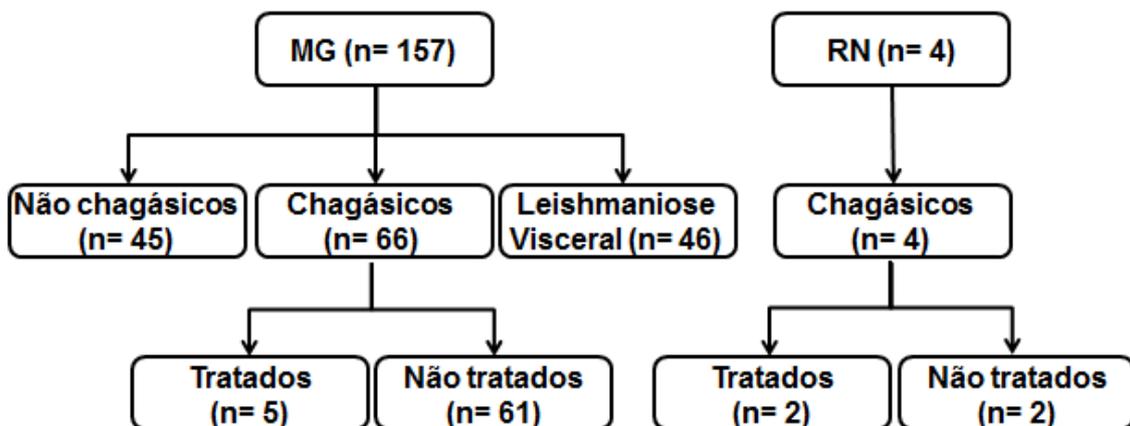


Figura 1. Fluxograma da procedência e distribuição das amostras por grupo e tratamento etiológico com benznidazol (n= número de amostras; MG= Minas Gerais; RN= Rio Grande do Norte).

Os indivíduos diagnosticados como infectados pelo *T. cruzi* apresentaram sorologia reativa para IgG anti-*T. cruzi*, por meio de ELISA e RIFI ou HAI, de acordo com o Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (BRASIL, 2005) e tiveram sangue coletado para hemocultura. Os pacientes com cardiopatia chagásica crônica (CCC) foram classificados com base no critério estabelecido pelo CTR/DIP. Os pacientes portadores da forma cardíaca foram agrupados de acordo com o grau de acometimento da doença em cinco níveis de CCC: pacientes CCC1, assintomáticos, sem alterações

significantes no exame físico ou de imagens; os CCC2, assintomáticos, porém com alguma alteração no eletrocardiograma (ECG); os CCC3, sintomáticos, com alterações consideráveis no ECG; os CCC4, sintomáticos, com alterações graves no ECG e na condução elétrica cardíaca, porém sem aumento cardíaco; e os CCC5, sintomáticos, com sinais clínicos, radiológicos e de eletrocardiograma claros de aumento cardíaco, com ou sem insuficiência cardíaca (ROCHA, RIBEIRO & TEIXEIRA, 2003; ROCHA, TEIXEIRA & RIBEIRO, 2007). A gravidade, portanto, segue a ordem: CCC5 > CCC4 > CCC3 > CCC2 > CCC1. As informações referentes aos pacientes chagásicos, não chagásicos e com LV estão sumarizadas na **Tabela 1**.

2.2. Preparo das Q β virus-like particles (Q β -VLP)

O vírus bacteriófago Q β foi utilizado como modelo para a síntese da Q β -VLP, realizada em colaboração com o Dr. M. G. Finn, do *Georgia Institute of Technology*, Atlanta, Georgia, USA. Aproximadamente 150mg de partículas purificadas foram isoladas por litro de cultura a partir do sistema de expressão em *E. coli*. As partículas funcionalizadas foram preparadas como resumido na **Figura 2** e como detalhado por 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 α -Gal-alcino (HONG et al., 2009).

Uma média de 540 unidades do epítipo α -Gal ou do carboidrato glicose foram ligadas por partícula, de acordo com a análise por espectrometria de massa, e a estrutura do capsídeo permaneceu intacta e altamente estável para armazenamento em longo prazo. A cadeia terminada em alcino no α -Gal-alcino foi ligada por meio de uma ligação β ao resíduo GalNAc.

Tabela 1 – Informações clínico-laboratoriais e epidemiológicas de indivíduos provenientes de regiões endêmicas dos estados de Minas Gerais e Rio Grande do Norte, Brasil.

Grupo	Forma clínica	CCC	Número de indivíduos	Idade (hemocultura)	Procedência do soro	Tratamento etiológico	
Chagásicos	Cardíaca	CCC1	2	29(+), 61(+)	MG	Não	
			1	55(ND)	RN		
		CCC2	2	51(+), 59(+)	MG	Não	
			1	38(ND)	RN		
		CCC3	10	38(-), 45(+), 52(+), 53(+), 55(+), 62(-), 64(-), 72(-), 81(-), 85(-)	MG	Não	
		CCC4	4	44(+), 49(+), 57(+), 60(+)	MG	Não	
	CCC5	27	42(+), 48(-), 49(+), 52(+), 57(-), 57(-), 58(+), 59(-), 59(+), 60(-), 60(-), 60(+), 61(-), 62(-), 62(-), 62(+), 63(+), 63(+), 63(-), 63(+), 64(+), 65(+), 70(+), 71(+), 73(-), 74(+), 82(+)	MG	Não		
		ND	1	45(ND)	MG	Sim	
		Indeterminada	NA	16	37(+), 38(+), 39(+), 40(-), 40(-), 40(-), 41(-), 42(+), 42(+), 45(-), 46(-), 56(-), 60(-), 63(-), 66(+), 74(+)	MG	Não
	2			45(ND), 69(ND)	RN	Sim	
4	20(ND), 27(ND), 39(ND), 51(ND)			MG	Sim		
Não chagásicos	NA	NA	45	ND(NA)	MG	NA	
Leishmaniose visceral	NA	NA	46	ND(NA)	MG	NA	

CCC= cardiopatia chagásica crônica; (+)= positiva; (-) = negativa; MG= Minas Gerais; RN= Rio Grande do Norte; ND= não disponível; NA= não se aplica.

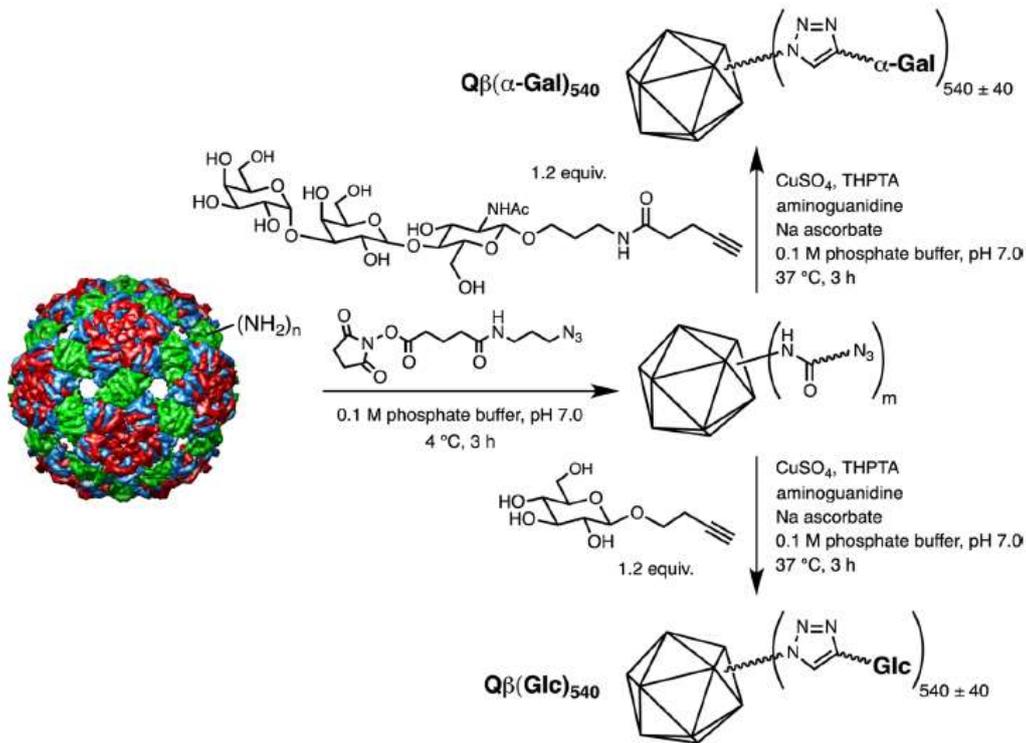


Figura 2. Síntese das *virus-like particles* (VLP) Qβ(α-Gal)₅₄₀ e Qβ(α-Glc)₅₄₀. Resumo das etapas realizadas para ligar covalentemente o trissacarídeo α-Gal [Galα(1,3)Galβ(1,4)GlcNAcα] ou a glicose (Glc) à VLP por ligação azida/alcino. A imagem na esquerda é uma representação da estrutura cristalina por raios-X da partícula Qβ (BRITO et al., 2016).

2.3. Obtenção de tripomastigotas e preparação do extrato total de epimastigotas de *T. cruzi*

Tripomastigotas de *T. cruzi* (Cepa Y – DTU TcII), derivadas de cultura de células, foram obtidas cinco a nove dias após infecção de células LLC-MK2 (ATCC, Manassas, VA), mantidas a 37°C em atmosfera de CO₂ a 5% em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado (ANDREWS & COLLI, 1982).

Epimastigotas foram cultivadas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) contendo 10% de SFB inativado. O extrato total de epimastigotas foi obtido como descrito por Almeida et al. (1997), com algumas modificações. Após sete a dez dias em meio de cultura LIT, as formas epimastigotas foram coletadas por centrifugação e lavadas três a cinco vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,4 (8g de NaCl, 0,2g de KCl, 1,44g de Na₂HPO₄, 0,24g de KH₂PO₄, água destilada q.s.p. 1L). A seguir as epimastigotas foram centrifugadas a 12.000 × g durante 30min a 4°C. Imediatamente a seguir os parasitos foram ressuspensos em tampão de (tris-(hidroximetil)-

aminometano)-ácido clorídrico (Tris-HCl) a 10 mM, pH 7,4, contendo 0,2 de leupeptina, EDTA 2-3 mM, 1% de nonanoil-N- metilglucamida (tampão de lise). As epimastigotas foram então submetidas a quatro a seis ciclos de congelamento e descongelamento, em nitrogênio líquido e banho-maria a 37°C, respectivamente. O lisado resultante foi centrifugado a $12.000 \times g$ durante 10min, a 4°C, e o sobrenadante contendo a preparação antigênica “EpEx” foi armazenado a -80°C até sua utilização.

2.4. Purificação de mucinas de tripomastigotas de *T. cruzi*

As mucinas foram obtidas de acordo com o protocolo de Almeida et al. (2000), com algumas modificações. Inicialmente, o sedimento contendo 1×10^{10} tripomastigotas (cepa Y) foi submetido a ciclos de congelamento e descongelamento e em seguida deslipidado três vezes com dez volumes de clorofórmio:metanol:água (1:2:0,8, v/v/v), seguido por clorofórmio:metanol (2:1, v/v). Entre cada extração, os restos celulares insolúveis foram separados da fase orgânica por centrifugação a $2.000 \times g$ por 20min a temperatura ambiente. O sedimento final de parasitos foi seco em fluxo de nitrogênio seguido por uma extração com 10 volumes de 1-butanol em água (9% de 1-butanol) por 16-18h a 4°C, sob agitação. A fase solúvel foi separada por centrifugação. Essa etapa foi repetida três vezes e os extratos resultantes foram combinados, liofilizados, dissolvidos em 5% de 1-propanol e 0,1M de acetato de amônio (tampão A), e então aplicados em uma coluna (1/10cm) de Octyl-Sepharose (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) com fluxo de 1 mL/min à temperatura ambiente. Após lavagem com dez volumes de tampão A e dez volumes de 5% de 1-propanol, a coluna foi eluída utilizando 1-propanol, a um fluxo de 12 mL/h. Oito frações de 1 mL foram coletadas e testadas por ELISA de quimioluminescência (CL-ELISA), usando anticorpos IgG anti- α -Gal de indivíduos chagásicos para detectar a presença de mucinas. As frações contendo as mucinas foram reunidas, secas por centrifugação a vácuo e armazenadas a -20°C.

2.5. Hemocultura

A hemocultura foi realizada conforme descrita por Chiari et al. (1989) com algumas modificações. Um total de 30mL de sangue venoso foi coletado em tubos à vácuo contendo heparina e o plasma foi separado por centrifugação a $300 \times g$ por 10min a 4°C. Ao sedimento de hemácias foram adicionados 10mL de meio LIT e centrifugado

a $900 \times g$ por 20min a 4°C . O sobrenadante foi descartado, e as células restantes foram divididas em seis tubos estéreis contendo 3mL de meio LIT. O tubo contendo plasma foi centrifugado nas mesmas condições e o plasma foi então armazenado a -20°C , e ao sedimento obtido do plasma foram adicionados 5mL de LIT. Os sete tubos foram incubados a $26-28^{\circ}\text{C}$ em estufa BOD (*Biochemical Oxygen Demand*). Os tubos foram agitados duas a três vezes por semana para homogeneizar a cultura, e alíquotas de $10\mu\text{L}$ da suspensão foram examinadas quanto à presença de parasitos ao microscópio óptico, entre lâmina e lamínula, com aumento de $400 \times$, mensalmente até 150 dias.

2.6. ELISA

As amostras de soro foram testadas frente aos antígenos $\text{Q}\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$, $\text{Q}\beta(\text{Glc})_{540}$, tGPI-mucina e EpEx. Para padronização, diferentes concentrações de antígenos foram utilizadas, variando de 1-100ng/poço para $\text{Q}\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$ e $\text{Q}\beta(\text{Glc})_{540}$, e 10-500ng/poço para EpEx e tGPI-mucina, assim como diferentes diluições de soro, variando de 1:100 a 1:6.400. Para as análises individuais, a diluição de 1/800 apresentou melhor desempenho, sendo portanto utilizada.

Inicialmente, os antígenos foram imobilizados em uma placa de ELISA de poliestireno de 96 poços Nunc[®] (Thermo Fischer Scientific), em tampão carbonato/bicarbonato 50mM pH 9,5. Após incubação overnight a 4°C , sítios livres de ligação foram bloqueados com BSA 2% (Sigma-Aldrich) em PBS, pH 7,4. As placas foram incubadas com $50\mu\text{L}$ de soro humano, na diluição de 1:800 em PBS contendo 2% de BSA (PBS/BSA 2%). As placas foram então sequencialmente incubadas com $50\mu\text{L}$ de anticorpo anti-IgG humano conjugado com biotina (diluição de 1:2500) (GE Healthcare) em PBS/BSA 2%, e $50\mu\text{L}$ de estreptavidina conjugada com a enzima *horseradish peroxidase* (HRP) (diluição 1:4000) (GE Healthcare) em PBS/BSA 2%. Todas as etapas foram realizadas a 37°C por 1h. As placas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 após cada período de incubação. A reação foi desenvolvida com $100\mu\text{L}$ 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 (Termo Scientific) a um comprimento de onda de 492nm. Em cada placa foram incluídos um controle positivo (pool de 20 soros de indivíduos chagásicos crônicos), um controle negativo (pool de 20 doadores não chagásicos de áreas endêmicas), e um controle de

background (tampão de incubação sem soro adicionado), os quais foram realizados em triplicata. Partículas Q β (Glc)₅₄₀ foram utilizadas como controle negativo, esperando que essas não proporcionassem nenhum sinal acima do *background*, nem mesmo para as amostras de soro do controle positivo.

2.7. Citometria de fluxo

A presença do resíduo α -Gal em diferentes DTUs do *T. cruzi* foi analisada por citometria de fluxo. Formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Cepas Colombiana e Arequipa - TcI, Cepa Y – TcII e Clone CL Brener – TcVI) foram centrifugadas a 2000 \times g por 10min a 4°C, lavadas três vezes com PBS e ressuspensas em 2% de paraformaldeído em PBS. As tripomastigotas foram então lavadas duas vezes com PBS e incubadas com 5% de SFB em PBS por 20min à temperatura ambiente. Em seguida, os parasitos foram incubados com a aglutinina de *Marasmius oreades* (MOA) ligada a isotiocianato de fluoresceína (FITC), na diluição de 1:50 por 20min à temperatura ambiente. Essa lectina se liga especificamente ao terminal Gal α 1-3Gal (WINTER, MOSTAFAPOUR & GOLDSTEIN, 2002; LOGANATHAN et al., 2003). Após lavagem, as células foram ressuspensas em 150 μ L de PBS. Os dados foram coletados no citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson). O experimento foi realizado em duplicata e 50 mil eventos foram adquiridos para cada amostra. Os dados foram analisados no software FlowJo X.0.7 (Tree Star Inc.).

2.8. Análise estatística

Todas as amostras foram analisadas em triplicata e avaliadas pelo menos duas vezes para todos os experimentos. Para os ensaios de ELISA, o valor de corte (*cut-off*) foi definido como a média da densidade ótica das amostras soronegativas (n=45) mais duas vezes o desvio padrão. Os resultados foram normalizados para uma escala de 1 a 10 pela seguinte equação: valor normalizado (título) = 1 + [9 (x - A) / (B - A)], sendo A o valor mínimo observado, B o valor máximo observado, e x o valor individual observado.

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad[®] Prisma versão 5.0. A distribuição normal dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, o teste t não pareado foi utilizado para a análise comparativa entre dois conjuntos de dados, e o ANOVA para três ou mais grupos. As diferenças entre os

grupos foram avaliadas pelo pós-teste de Tukey, e consideradas significativas quando $p < 0,05$.

A sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia (ACC) foram calculados como se segue: $S = VP / (VP + FN)$ (sendo VP = verdadeiro positivo e FN = falso negativo); $E = VN / (VN + FP)$ (sendo VN = verdadeiro negativo e FP = falso positivo); $VPP = VP / (VP + FP)$; $VPN = VN / (VN + FN)$; e $ACC = (VP + VN) / (VP + FP + VN + FN)$.

3. RESULTADOS

Inicialmente, a reatividade de três pools de soro foi avaliada colorimetricamente através de ensaio de ELISA utilizando os antígenos Q β (Glc)₅₄₀, Q β (α -Gal)₅₄₀, tGPI-mucina, EpEx. Cada pool continha 20 soros selecionados aleatoriamente, divididos nos seguintes grupos: indivíduos chagásicos crônicos não tratados (ChP), utilizados como controle positivo; indivíduos não chagásicos (Não-ChP), utilizados como controle negativo; e indivíduos com leishmaniose visceral (LV), para verificar a existência de reatividade cruzada.

As concentrações dos antígenos e a diluição das amostras foram escolhidas com base nas condições que apresentassem maior diferença na reatividade do soro de indivíduos chagásicos e não chagásicos. O melhor ponto de antigenicidade para o Q β (α -Gal)₅₄₀ foi obtido a uma concentração de 125ng/mL (6,25ng/poço). Para o tGPI-mucina e EpEx, os melhores pontos foram alcançados nas concentrações de 2,5 μ g/mL (125ng/poço) e 5 μ g/mL (250ng/poço), respectivamente. A partícula Q β (Glc)₅₄₀ foi utilizada na mesma concentração do Q β (α -Gal)₅₄₀, como controle do antígeno. Embora uma série de sete diluições tenha sido testada (de 1/100 a 1/6.400) para os três pools de soros, as razões mais elevadas de sinal entre ChP \times Não-ChP para os antígenos Q β (α -Gal)₅₄₀, tGPI-mucina e EpEx foram obtidas quando os soros foram diluídos entre 1/100 e 1/800.

A reatividade do pool de soros dos indivíduos ChP frente aos antígenos Q β (α -Gal)₅₄₀, tGPI-mucina e EpEx foi significativamente mais elevada quando comparada ao pool de Não-ChP e LV, nas diluições de 1/100 a 1/800 ($p < 0,05$). Além disso, foi observada uma baixa reatividade do pool ChP frente ao antígeno Q β (Glc)₅₄₀, evidenciando a especificidade de ligação dos anticorpos ao terminal α -Gal e não à partícula viral utilizada como plataforma. Quando comparado à tGPI-mucina e ao EpEx, o antígeno Q β (α -Gal)₅₄₀ apresentou a reatividade mais elevada para o pool de ChP, assim como uma baixa reatividade com o pool de soros de indivíduos LV, apresentando uma menor possibilidade de reatividade cruzada (**Figura 3**). A próxima etapa consistiu em analisar um painel de amostras de soro de indivíduos não tratados infectados pelo *T. cruzi* (n=61), não infectados (n=45) e indivíduos com LV (n=46). A diluição de 1/800 apresentou os melhores resultados quando os soros foram analisados individualmente, sendo utilizada para a realização do ELISA.

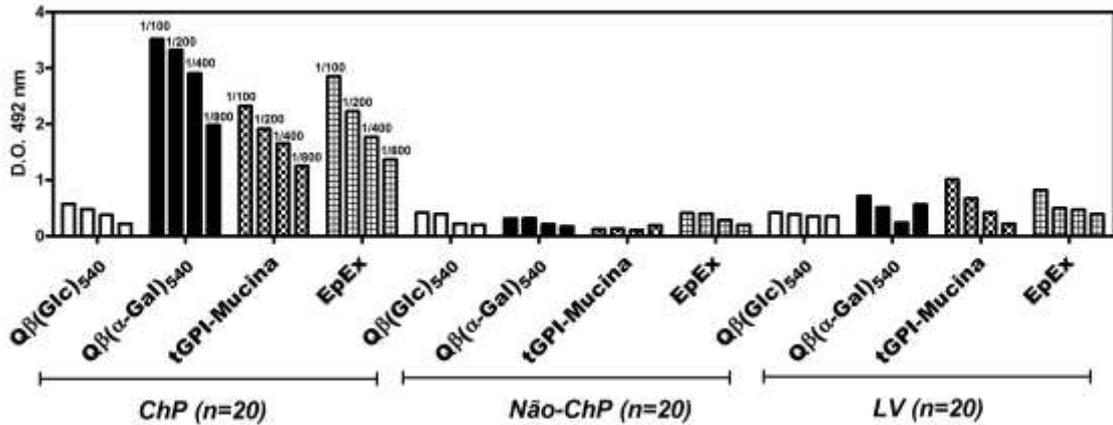


Figura 3. Antigenicidade de pool de soros de indivíduos chagásicos (ChP), não chagásicos (Não-ChP) e com leishmaniose visceral (LV) frente aos antígenos Qβ(Glc)₅₄₀, Qβ(α-Gal)₅₄₀, tGPI-mucina e EpEx. A concentração de antígeno por poço foi de 125 ng/mL para Qβ(Glc)₅₄₀ e Qβ(α-Gal)₅₄₀, 2,5 µg/mL para tGPI-mucina e 5 µg/mL para EpEx. Cada experimento foi realizado com quatro diluições em série (da esquerda para a direita), a 1/100, 1/200, 1/400 e 1/800. A densidade óptica (D.O.) foi medida a 492nm. A análise estatística mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos ChP × Não-ChP e ChP × LV para os antígenos Qβ(α-Gal)₅₄₀, tGPI-mucina e EpEx em todas as diluições utilizadas.

Os soros dos indivíduos pertencentes aos grupos ChP, não-ChP e LV apresentaram um perfil de reatividade semelhante frente aos três antígenos utilizados, com diferença significativa entre os grupos ChP × Não-ChP e ChP × LV ($p < 0,05$), porém com diferentes valores de sensibilidade e especificidade. A **figura 4A** mostra a reatividade dos soros frente ao antígeno EpEx. Esse antígeno gerou o maior número de resultados falso negativos comparado aos outros dois, porém apresentou um baixo número de resultados falso positivos, contribuindo para uma melhor especificidade. Na **figura 4B**, utilizando o antígeno tGPI-mucina, foi observada uma melhor reatividade do soros ChP comparado com o antígeno EpEx, contudo o número de indivíduos do grupo LV com resultados falso positivos foi mais elevado. A **figura 4C** mostra a reatividade frente ao antígeno Qβ(α-Gal)₅₄₀. Os soros dos indivíduos ChP apresentaram uma forte resposta ao antígeno Qβ(α-Gal)₅₄₀ e produziram os melhores resultados com relação à reatividade cruzada. A utilização desse antígeno gerou a maior razão entre os títulos dos soros de indivíduos ChP × Não-ChP e LV, quando comparado com as amostras de soro testadas frente ao EpEx e tGPI-mucina. Conforme mostrado na **tabela 2**, a sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e ACC do Qβ(α-Gal)₅₄₀ foram melhores quando comparadas aos antígenos EpEx e tGPI-mucina.

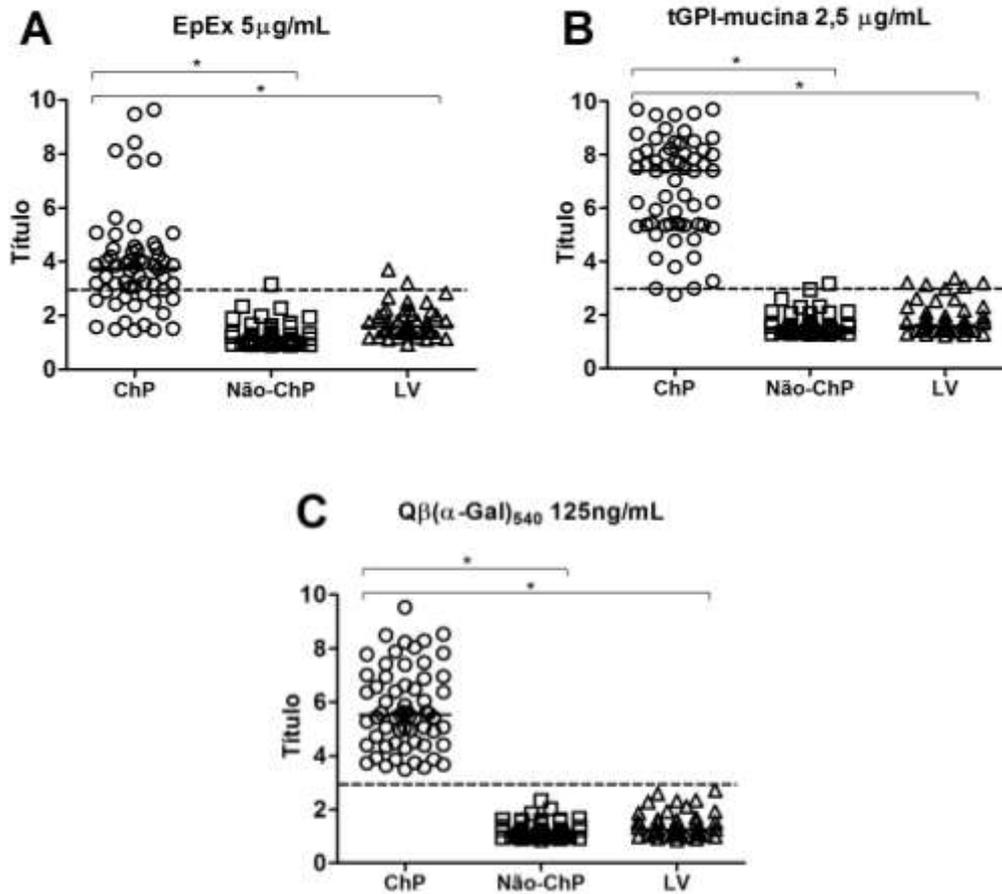


Figura 4. Antigenicidade de soros de indivíduos chagásicos (ChP), não chagásicos (Não-ChP) e com leishmaniose visceral (LV) frente aos antígenos EpEx (A), tGPI-mucina (B) e Qβ(α-Gal)₅₄₀ (C). A reatividade foi analisada em soros de pacientes chagásicos crônicos não tratados (ChP) (n= 61), indivíduos não infectados pelo *T. cruzi* (n= 45), e infectados pela *Leishmania infantum* (leishmaniose visceral) (n= 46). As linhas pontilhadas indicam o valor corte. * diferença significativa entre grupos (p<0,05). A linha contínua indica a mediana.

Tabela 2 – Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia (ACC) para os antígenos EpEx, tGPI-mucina e Qβ(α-Gal)₅₄₀ frente a um painel de soros de indivíduos chagásicos (ChP), não chagásicos (Não-ChP) e com leishmaniose visceral (LV).

	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	ACC
EpEx	77,0%	96,7%	94,0%	86,3%	88,8%
tGPI-mucina	93,4%	95,6%	96,6%	91,5%	94,3%
Qβ(α-Gal)₅₄₀	100%	100%	100%	100%	100%

A próxima etapa do estudo consistiu em classificar os soros dos 61 indivíduos ChP, todos sem tratamento etiológico, de acordo com a forma clínica (cardiopatía chagásica crônica ou indeterminada), hemocultura e idade, procurando verificar a existência ou não de uma associação entre essas variáveis e a reatividade no ELISA. Os soros foram testados quanto à produção de anticorpos anti- α -Gal frente ao antígeno $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$, e os resultados foram plotados para a forma clínica (**Figura 5A**), hemocultura (**Figura 5B**) e idade (**Figura 5C**). Nenhuma associação foi encontrada para quaisquer desses parâmetros.

Quatro pacientes chagásicos crônicos provenientes de uma região endêmica para DC do estado do Rio Grande do Norte, sendo dois tratados com benznidazol e dois não tratados, foram seguidos por 24 meses, e as amostras de soro foram coletadas no mês 1, 6, 12, 18 e 24 após o tratamento para verificação dos títulos de anticorpos anti- α -Gal. Estas amostras foram testadas frente ao antígeno $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$, mostrando que os pacientes tratados apresentaram uma tendência à diminuição no título de anticorpos anti- α -Gal em relação aos não tratados com o passar do tempo (**Figura 6A**).

Em outro ensaio, amostras de cinco pacientes chagásicos crônicos provenientes do estado de Minas Gerais foram coletadas em diferentes tempos antes e após tratamento etiológico com benznidazol, e a produção de anticorpos anti- α -Gal foi avaliada por ELISA frente ao $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$, evidenciando também uma diminuição na produção de anticorpos anti- α -Gal após o tratamento. Esse padrão persistiu por longos períodos, como representado pelo paciente TP019, que foi acompanhado por 95 meses (**Figura 6B**).

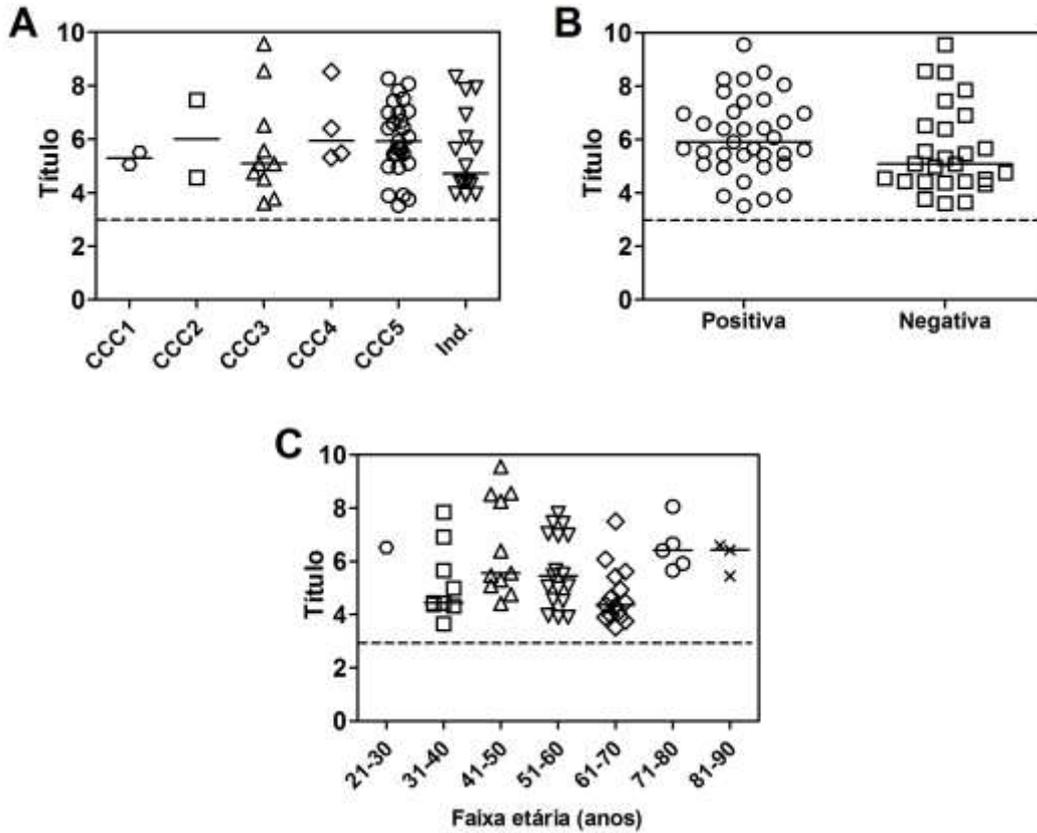


Figura 5. Reatividade do soro de indivíduos infectados pelo *T. cruzi* e não tratados, classificados quanto à forma clínica (A), hemocultura (B) e idade (C). O soro foi utilizado numa diluição de 1/800, e o antígeno Q β (α -Gal)₅₄₀ foi utilizado a uma concentração de 125ng/mL. A grau de acometimento cardíaco segue a ordem CCC5 > CCC4 > CCC3 > CCC2 > CCC1. Ind. representa os pacientes indeterminados. As linhas pontilhadas indicam o valor corte. A linha contínua indica a mediana

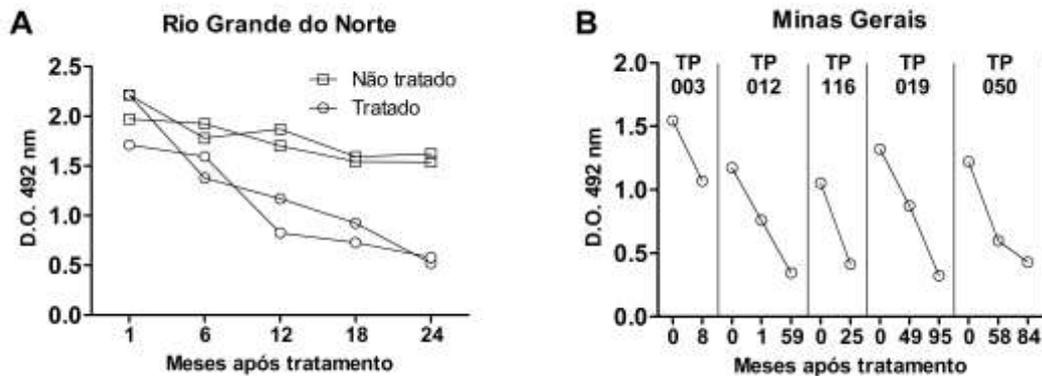


Figura 6. Reatividade frente ao antígeno Q β (α -Gal)₅₄₀ do soro de indivíduos tratados e não tratados por benznidazol, para acompanhamento da produção de anticorpos anti- α -Gal.

Por último, para verificar a presença do resíduo α -Gal em diferentes DTUs de *T. cruzi*, tripomastigotas de quatro cepas foram analisadas por citometria de fluxo, através da ligação da lectina MOA conjugada ao FITC. Todas as DTUs avaliadas apresentaram esse resíduo, apesar de exibirem diferentes proporções, como a cepa Colombiana (TcI) com 36,4%, cepa Arequipa (TcI) com 76,4%, cepa Y (TcII) com 60% e clone CL-Brener (TcVI) com 58% (**Figura 7**).

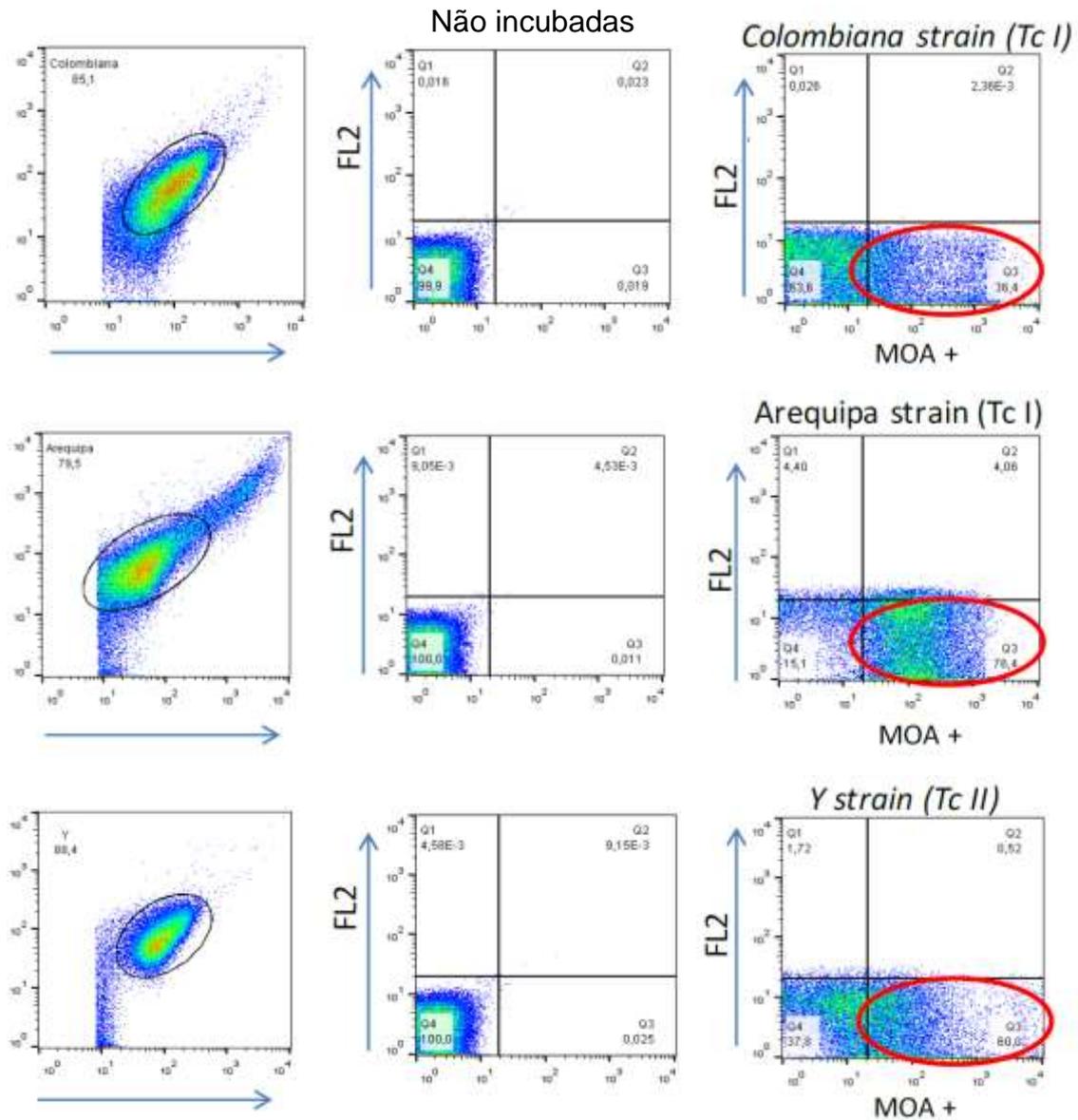


Figura 7. Gráfico de citometria de fluxo mostrando a população de células escolhidas (esquerda), a porcentagem de fluorescência de tripomastigotas não incubadas com MOA-FITC (meio) e após incubação com MOA-FITC (direita).

4. DISCUSSÃO

Diferentes antígenos têm sido utilizados para o diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*, mas atualmente ainda não existe um teste que seja considerado padrão-ouro para o diagnóstico na fase crônica da infecção. O número considerável de resultados inconclusivos e o aparecimento de reações cruzadas com outros tripanossomatídeos apontam para a necessidade do desenvolvimento de ferramentas diagnósticas que apresentem uma melhor sensibilidade e especificidade, e que ofereçam uma boa relação custo-eficácia.

O uso de plataformas que possibilitem o acoplamento de diferentes antígenos e apresentem uma boa estabilidade química é de fundamental importância para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico. Nesse contexto, as VLP aparecem como alternativas promissoras, tanto pela sua estabilidade físico-química quanto pela possibilidade de acoplamento de uma elevada quantidade de um ou mais antígenos numa mesma partícula.

Em estudos preliminares realizados pelo nosso grupo (dados não publicados), partículas Q β -VLP exibindo 180 unidades do epítipo α -Gal em sua superfície foram utilizadas para diagnóstico sorológico da infecção pelo *T. cruzi* na fase crônica. Os resultados mostraram uma boa sensibilidade e especificidade do teste, no entanto foi observada a existência de amostras falso negativas e falso positivas, assim como reatividade cruzada com LV. Com o intuito de aumentar a sensibilidade e especificidade do teste e reduzir ou eliminar a reatividade cruzada com LV, a quantidade do epítipo α -Gal exibido na plataforma Q β -VLP foi aumentada de 180 para 540, tornando essas moléculas ainda mais acessíveis aos anticorpos anti- α -Gal produzidos em resposta à exposição ao *T. cruzi*. O aumento dessa densidade deste epítipo poderia não somente fornecer um maior número de moléculas alvo para esses anticorpos, como aumentar a avidéz da ligação, provavelmente pela ligação das duas porções Fab do anticorpo, evidenciando que a exposição do epítipo α -Gal por diferentes fontes ou mecanismos pode interferir no reconhecimento por esses anticorpos.

O epítipo α -Gal representa um excelente alvo para avaliação sorológica na infecção pelo *T. cruzi*. Em primeiro lugar, é altamente expresso em tripomastigotas de *T. cruzi* e é o principal epítipo responsável pela produção de elevados níveis de anticorpos anti- α -Gal protetores em indivíduos infectados pelo parasito (ALMEIDA et al., 1991; TRAVASSOS & ALMEIDA, 1993; ALMEIDA et al., 2000). Por outro lado, anticorpos anti- α -Gal que estão presentes normalmente em todos os indivíduos

saudáveis (ROTHER & SQUINTO, 1996; GALILI, 2013) são direcionados contra resíduos terminais de α -Gal presentes em diferentes núcleos de oligossacarídeos ou O-antígenos de lipopolissacarídeos de bactérias gram-negativas (WILKINSON, 1996). Estes anticorpos anti- α -Gal de indivíduos saudáveis não reconhecem especificamente *T. cruzi* e apresentam pouco poder tripanolítico (ALMEIDA et al., 1991; ALMEIDA et al., 1994). Em segundo lugar, a diversidade genética observada em diferentes cepas ou isolados de *T. cruzi*, que pode diminuir a sensibilidade e a especificidade dos testes diagnósticos disponíveis, parece não interferir fortemente na presença do α -Gal, fazendo com que os ELISAs utilizando esse epítipo sejam provavelmente aplicáveis para todas as DTUs. De fato, a presença do resíduo α -Gal foi evidenciada através de citometria de fluxo na superfície de diferentes DTUs, corroborando com outros trabalhos encontrados na literatura (ALMEIDA et al., 1993; SOARES et al., 2012; IZQUIERDO et al., 2013).

O antígeno utilizado para diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* pode gerar uma elevada discrepância entre testes sorológicos e por consequência resultados altamente discordantes. Um estudo recente utilizou uma combinação de cinco testes de ELISA baseados em diferentes preparações antigênicas para avaliar a soroprevalência da infecção pelo *T. cruzi* em uma população rural de Veracruz, México. Dois ELISAs *in-house* foram desenvolvidos utilizando extratos brutos de epimastigotas do *T. cruzi*, um do clone CL-Brener, isolado de *Triatoma infestans* no Rio Grande do Sul, Brasil, e o outro da cepa LJ01, isolada de *Triatoma dimidiata* em Veracruz, México. Os outros três ELISAs foram provenientes de kits disponíveis comercialmente, amplamente utilizados para o diagnóstico da infecção em países da América do Sul, e apresentam em sua composição antígenos purificados ou proteínas recombinantes. Os resultados mostraram uma maior sensibilidade dos ELISAs desenvolvidos *in-house* e uma capacidade bastante limitada dos testes comerciais em detectar a infecção pelo *T. cruzi* naquela população (GUZMÁN-GOMEZ et al., 2015). Uma vez que regiões geográficas distintas ou ainda uma mesma região podem apresentar diferentes genótipos do *T. cruzi* (CÂMARA et al., 2010), diferenças na sororreatividade podem estar associadas a variações no genótipo ou composição antigênica dos parasitos utilizados para o diagnóstico. Portanto, é essencial integrar evidências epidemiológicas, clínicas e laboratoriais, a fim de aumentar o grau de precisão preditiva e diagnóstica dos testes utilizados (DIAS et al., 2016).

O uso de métodos de PCR quantitativa (qPCR) para detectar o *T. cruzi* no sangue periférico de indivíduos chagásicos tem exibido uma boa sensibilidade e

especificidade quando comparado à sorologia (MELO et al., 2015; RAMÍREZ et al., 2015). Contudo, estes métodos são caros e a sensibilidade encontrada não é suficiente para a aplicação da qPCR como um teste confirmatório em doadores de sangue ou em indivíduos com sorologia positiva (RAMÍREZ et al., 2015).

A capacidade da partícula $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$ em diferenciar, com 100% de sensibilidade e especificidade, indivíduos chagásicos dos não chagásicos, incluindo aqueles com leishmaniose visceral, é bastante promissora. Esse nível eficiente de diferenciação pode ser resultado de dois fatores: primeiro, como já mencionado, a apresentação de uma quantidade mais elevada do trissacarídeo na VLP pode favorecer uma ligação antígeno-anticorpo mais eficiente, mesmo nos casos de pacientes com baixa produção de anticorpos anti- $\alpha\text{-Gal}$; segundo, a partícula $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$ apresenta uma composição altamente homogênea, não apresentando nenhum outro epítipo de glicano ou peptídeo que possa estar relacionado com a infecção.

O uso do $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$ para diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* apresenta uma grande vantagem em relação à quantidade de amostra utilizada. Enquanto o ELISA utilizando esse antígeno requer menos de 1 μL de soro, uma quantidade facilmente obtida por punção digital, por exemplo, e sem a necessidade de punção venosa direta, kits comercialmente disponíveis utilizam 20-40 μL de soro do indivíduo para que o teste seja realizado em duplicata. Outro importante fator está relacionado ao ponto de vista econômico, uma vez que devido à elevada densidade do epítipo $\alpha\text{-Gal}$ disponível para ligação, a quantidade de antígeno utilizada é bastante baixa, encontrando-se na escala de nanogramas.

Além de todas as vantagens acima descritas, uma das mais importantes reside no fato da reatividade do soro frente ao antígeno $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$ não apresentar associação com relação à forma clínica, hemocultura e idade nos indivíduos chagásicos crônicos utilizados nesse estudo. Esses aspectos são extremamente importantes para um teste que procura diagnosticar a infecção pelo *T. cruzi*, uma vez que a ausência de associação entre a reatividade e a forma clínica cardíaca ou indeterminada englobaria a quase totalidade dos indivíduos infectados. Estudos posteriores devem ser realizados para verificar a reatividade do soro de indivíduos que apresentam a forma digestiva da doença. Interessante ainda observar que uma não associação entre a reatividade e a CCC indica que o diagnóstico independe do grau de cardiopatia, sendo eficiente até mesmo para os casos de menor comprometimento cardíaco. Com relação à positividade ou não da hemocultura, poderia ter-se a ideia que indivíduos com hemocultura positiva

apresentassem uma maior reatividade no ELISA utilizando o Q β (α -Gal)₅₄₀, uma vez que a presença de parasitos circulantes estivesse proporcionando um estímulo constante para a produção de anticorpos anti- α -Gal. No entanto, não foi observada associação entre positividade pela hemocultura e reatividade. Este achado é importante porque sugere que o teste baseado nessa VLP será útil para a maioria dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, que são assintomáticos e cronicamente infectados e, portanto, apresentam parasitemia baixa e intermitente (MONCAYO & SILVEIRA, 2009; NUNES et al., 2013). Finalmente, foi verificado que a idade desses indivíduos, que poderia estar associada com o tempo de contato com o parasito, não influenciou a reatividade do teste, não interferindo na eficácia em diagnosticar corretamente a infecção pelo *T. cruzi*. Esse é outro aspecto bastante interessante, mostrando que para esse teste é importante apenas que os indivíduos estejam na fase crônica, independente de quanto tempo eles encontram-se infectados.

Por fim, o antígeno Q β (α -Gal)₅₄₀ mostrou-se como uma potencial ferramenta para avaliar eficácia terapêutica em pacientes que foram submetidos a tratamento etiológico pelo benznidazol. Enquanto indivíduos chagásicos não tratados apresentaram níveis elevados de anticorpos anti- α -Gal durante o curso da infecção, aqueles tratados apresentam uma redução mais acentuada nos níveis desses anticorpos com o passar do tempo. Os resultados podem ser comparados com estudos anteriores nos quais os pacientes foram seguidos utilizando tGPI-mucinas purificadas (ANDRADE et al., 1996; ANDRADE et al., 2004). Esses estudos descreveram uma redução nos títulos de anticorpos líticos relacionada ao tratamento etiológico. Esses anticorpos são produzidos em resposta a moléculas presentes na superfície do parasito que contêm o epítipo α -Gal (GALVÃO et al., 1993; ALMEIDA et al., 1994). Deste modo, o antígeno Q β (α -Gal)₅₄₀ forneceu resultados muito semelhantes, permitindo a avaliação da eficácia ou falha do tratamento pela quantificação da produção de anticorpos anti- α -Gal durante longos períodos de tempo, após o tratamento etiológico, e podendo ser utilizado como um biomarcador para evolução da doença.

Esse antígeno apresenta um enorme potencial para uso em pesquisas de campo, uma vez que todos os indivíduos previamente identificados como positivos para infecção pelo *T. cruzi* por técnicas laboratoriais laborosas e que não exibem 100% de sensibilidade e especificidade foram corretamente identificados como positivos por este ensaio de ELISA, assim como aqueles não infectados ou infectados por LV foram corretamente identificados como negativos, sugerindo ainda sua aplicação para uma

triagem inicial em bancos de sangue e um provável indicador de cura ou remissão da doença de Chagas.

5. CONCLUSÕES

- A utilização de uma elevada densidade do epítopo α -Gal acoplado à Q β *virus-like particle* mostrou-se como uma excelente ferramenta para o diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* na fase crônica;

- A sensibilidade e especificidade do teste utilizando o antígeno Q β (α -Gal)₅₄₀ foram de 100% frente a um painel de soros de indivíduos infectados ou não pelo *T. cruzi*, e indivíduos com leishmaniose visceral, eliminando assim os resultados falso-positivos e falso-negativos, um dos principais problemas no diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*;

- A reatividade do soro de indivíduos infectados pelo *T. cruzi* utilizando o antígeno Q β (α -Gal)₅₄₀ foi independente do grau de cardiopatia chagásica crônica, hemocultura e idade, o que torna esse antígeno particularmente interessante para o uso como diagnóstico em indivíduos chagásicos crônicos;

- O antígeno Q β (α -Gal)₅₄₀ foi eficiente para o acompanhamento da produção de anticorpos anti- α -Gal em indivíduos chagásicos tratados, podendo ser avaliado como uma futura ferramenta para verificar a resposta ao tratamento etiológico.

CAPÍTULO 3

Avaliação de camundongos α -1,3-galactosiltransferase *knockout* como modelos experimentais na infecção pelo *T. cruzi*

1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Avaliar a resposta de camundongos $\alpha 1,3GT$ -WT e $\alpha 1,3GT$ -KO infectados pela cepa Y de *T. cruzi* frente aos parâmetros peso, parasitemia e mortalidade;
- 2- Comparar a produção de citocinas séricas e cardíacas em camundongos $\alpha 1,3GT$ -WT e $\alpha 1,3GT$ -KO;
- 3- Verificar a lise das formas tripomastigotas do *T. cruzi* frente a anticorpos anti- α -Gal obtidos de camundongos $\alpha 1,3GT$ -KO;
- 4- Avaliar a interferência *in vitro* e *in vivo* de anticorpos anti- α -Gal na infecção pelo *T. cruzi*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Camundongos e Parasitos

Camundongos (*Mus musculus*) fêmeas com fundo genético C57BL/6 foram utilizados para os experimentos, selvagens ou *knockout* para o gene da enzima α 1,3GT (α 1,3GT-WT e α 1,3GT-KO respectivamente), com idade variando de seis a oito semanas e peso variando entre 18 e 22 gramas. Os camundongos não passaram por qualquer privação alimentar ou hídrica, recebendo ração comercial específica para a espécie e água *ad libitum*. Estes animais foram mantidos em caixas de polipropileno alocadas em uma estante ventilada, no biotério do Departamento de Parasitologia da UFMG e no *Animal Facility* da UTEP.

Os animais foram desafiados com formas tripomastigotas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* (DTU TcII). Os parasitos foram mantidos em cultura de células LLC-MK2 ou *in vivo* através de sucessivas passagens via intraperitoneal de tripomastigotas sanguíneas em camundongos C57BL/6 e Swiss.

Camundongos α 1,3GT-WT e α 1,3GT-KO foram infectados intraperitonealmente com 1.000 tripomastigotas provenientes de cultura de células. Um grupo controle foi inoculado intraperitonealmente com PBS. Os animais foram observados quanto à parasitemia, perda de peso e percentual de sobrevivência. Experimentos separados foram realizados e a produção de anticorpos anti- α -Gal foi verificada em camundongos infectados e não infectados.

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, protocolo nº 255/2013 (**Anexo 3**) e pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso Animal (*Institutional Animal Care and Use Committee*) da UTEP (protocolos para animais vertebrados A-201211-1 e A-201411-1), e os animais manipulados de acordo com as recomendações desses comitês.

2.2. Parasitemia e taxa de sobrevivência

Os camundongos foram colocados numa caixa de retenção, de modo que somente a cauda ficasse exposta. Com uma tesoura, a ponta da cauda foi cuidadosamente cortada, e cinco microlitros de sangue foram obtidos da veia caudal e examinados entre lâmina e lamínula ao microscópio óptico na objetiva de 40x. O número de tripomastigotas sanguíneas móveis foi contado em 50 campos aleatoriamente observados, de forma que se distribuíssem por toda a área da lamínula. O fator de

correção foi calculado para cada microscópio utilizado. Os dados foram plotados como quantidade de tripomastigotas por μL de sangue (BRENER, 1962). A mortalidade dos animais foi monitorada diariamente e plotada como percentual de sobrevivência.

2.3. Variação de peso dos camundongos

Os camundongos foram pesados antes do desafio com tripomastigotas de *T. cruzi* (Cepa Y). Após a infecção, cada camundongo dos grupos infectado e não infectado foi pesado individualmente a cada três dias e a variação de peso foi determinada como um índice, calculado como o percentual de mudança desde o peso inicial comparado com o peso obtido após a infecção.

$$\% \text{ mudança de peso} = [(\text{peso atual}/\text{peso antes da infecção}) \times 100] - 100.$$

2.4. ELISA de quimioluminescência (CL-ELISA)

O CL-ELISA foi utilizado para avaliação da produção e especificidade de anticorpos anti- α -Gal. O sangue dos camundongos infectados e não infectados foi coletado através de punção do plexo retro-orbital, e o soro foi separado por centrifugação para a realização do CL-ELISA. Inicialmente, microplacas NUNC[®] MaxiSorp com 96 poços apropriadas para CL-ELISA (Thermo Fisher Scientific) foram sensibilizadas durante a noite a 4°C com 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (250 ng/poço) de Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-BSA (V-Labs) em tampão carbonato/bicarbonato 100mM, pH 9,6. Os poços foram bloqueados com PBS/BSA 1% a 37°C por 1h, e 50 μL de soro de camundongo (diluído em série a partir de 1:100 em PBS/BSA 1%) foram adicionados e incubados a 37°C por 1h. As placas foram lavadas 4x com PBS/Tween 20 0,05% e em seguida incubadas com 50 μL de IgG de cabra anti-camundongo (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; eBioscience[®]), IgG de asno anti-IgG de cabra conjugado com biotina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; eBioscience[®]), e streptavidina-peroxidase (1:2000; Zymed[®]) por 1h a 37°C para cada etapa. A reação foi desenvolvida adicionando 50 μL de substrato quimioluminescente de peroxidase (*SuperSignal ELISA Pico Chemiluminescent Substrate* - Thermo Fisher Scientific), diluído 1/8 em tampão carbonato/bicarbonato 100mM, pH 9,6. Unidades relativas de luminescência (RLU) foram medidas usando o Luminoskan (Thermo Fisher Scientific). Para verificar a especificidade do anticorpo, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do epítipo Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-BSA foram distribuídos numa placa de 96 poços e tratados overnight a 28°C com 0,1 U/poço da enzima α -galactosidase (*Coffee beans* – Sigma-Aldrich). Após incubação, o CL-ELISA foi realizado conforme protocolo descrito acima.

2.5. Dosagem de citocinas

A quantificação de citocinas foi realizada no soro dos camundongos semanalmente até quatro semanas após a infecção (SPI). Citocinas cardíacas foram avaliadas diretamente no homogenato total do coração também até quatro SPI. Para esse fim, 12 camundongos foram divididos em quatro grupos com três animais, e semanalmente um grupo era sacrificado e os corações removidos inteiramente e homogeneizados utilizando o IKA Ultra-Turrax® T25 digital em 2mL de PBS na presença de inibidor de protease (*Complete Mini* – Sigma-Aldrich). Os homogenatos foram centrifugados e o sobrenadante coletado e congelado a -80°C até serem utilizados. Para ambas as amostras, a medida das citocinas foi realizada através de kits de ELISA sanduíche de acordo com a instrução do fabricante (BD Biosciences). Os limites de detecção do ensaio foram os seguintes: 7,8 pg/mL para interleucina 2 (IL-2) e interleucina 4 (IL-4); 31,3 pg/mL para interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 10 (IL-10); e 62,5 pg/mL para interleucina 12 (IL-12). Todas as análises foram feitas em triplicata.

2.6. Ensaio lítico

O ensaio lítico foi realizado de acordo com o protocolo de Pereira-Chioccola et al. (2000), com algumas modificações. Tripomastigotas de *T. cruzi* (Cepa Y) foram obtidas após infecção de células LLC-MK2 mantidas a 37°C em atmosfera de CO_2 a 5% em meio DMEM com antibióticos (estreptomicina 100 UI/mL e penicilina 100 UI/mL) e 10% de soro fetal bovino inativado, e diluídas para uma concentração de 10^7 parasitos/mL. Em seguida, 5 μL da suspensão de tripomastigotas foram incubados a 37°C em atmosfera de CO_2 a 5% por 1h com 1, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de um pool de anticorpo anti- α -Gal de camundongos em uma placa de Terasaki de 60 poços (Robbins Scientific Corp.) ou em microtubos de 200 μL . Os controles foram incubados somente com o meio DMEM. Após incubação, o número de tripomastigotas móveis e livres (não aglutinadas) foi contado em uma câmara de Neubauer. Os resultados foram plotados como percentual de lise. O experimento foi realizado em triplicata.

2.7. Infecção de células LLC-MK2 tratadas ou não com anticorpos anti- α -Gal

Tripomastigotas de *T. cruzi* (Cepa Y) provenientes de cultura de células foram utilizadas para a infecção de células LLC-MK2, mantidas conforme condições descritas no item 2.6. As células LLC-MK2 foram aderidas a lamínulas de 15mm em DMEM suplementado com SFB e antibióticos em placas de cultura de tecidos com 24 poços. Após incubação *overnight* a 37°C em estufa de CO₂ a 5%, as células não aderidas foram removidas lavando quatro vezes com DMEM suplementado. As células aderidas foram infectadas com TCT (10:1 Parasitos:LLC-MK2) por 2 horas. Durante o processo de infecção, 100µg/poço do anticorpo anti- α -Gal purificado de camundongos foram adicionados. IgG não anti- α -Gal e somente meio foram usados como controle. Após o período de incubação, o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas três vezes com PBS estéril. Um novo meio foi adicionado e as células foram incubadas novamente em estufa de CO₂ a 5%. Após infecção, os parasitos no sobrenadante foram contados nos dias 3, 5, 6, 7 e 8. O experimento foi realizado em triplicata.

No oitavo dia pós-infecção, as células foram fixadas com formaldeído a 4% em PBS por 10min a 37°C, lavadas com PBS e permeabilizadas com Triton X-100 a 0,2% em PBS durante 5min em gelo. Após três lavagens com PBS, as células fixadas foram bloqueadas com PBS/BSA 1% durante 30 min à temperatura ambiente. Os parasitos internalizados foram corados com 1µg/mL de 4,6-diamidino-2-fenilindol dicloridrato (DAPI) (Invitrogen) e/ou imunomarcados com anticorpos anti-Gal purificados (1µg/mL) durante 2h à temperatura ambiente. A reação entre IgG anti- α -Gal purificado e os parasitos intracelulares foi detectada pela incubação com IgG de cabra anti-humano (2,2µg/mL) durante 1h à temperatura ambiente seguido por incubação com IgG de asno anti-cabra ligado a Alexa Fluor[®] 488 (10 µg/mL) durante 1h. A visualização de pelo menos 1.000 células foi feita por meio do microscópio confocal LS 510 (Zeiss). O experimento foi realizado em triplicata.

2.8. Análise estatística

O teste não paramétrico U de Mann-Whitney foi usado para comparação entre os grupos. Os resultados foram considerados significativos quando o valor de p foi menor que 0,05.

3. RESULTADOS

3.1. Resistência e susceptibilidade de camundongos $\alpha 1,3GT$ -WT e $\alpha 1,3GT$ -KO à infecção pelo *T. cruzi*

O desenvolvimento da infecção pelo *T. cruzi* foi avaliado em camundongos $\alpha 1,3GT$ -WT e $\alpha 1,3GT$ -KO após inoculação intraperitoneal de 1.000 tripomastigotas da cepa Y, provenientes de cultura de células LLC-MK2. A parasitemia foi mais controlada em camundongos $\alpha 1,3GT$ -KO, apresentando um pico 14 dias após a infecção (DPI). Os animais $\alpha 1,3GT$ -WT apresentaram duas vezes mais parasitos circulantes quando comparados ao grupo $\alpha 1,3GT$ -KO no pico da infecção, assim como uma parasitemia mais elevada durante todo o período avaliado (**Figura 1A**). Além disso, o grupo $\alpha 1,3GT$ -KO demonstrou ser mais resistente à infecção, apresentando um maior percentual de sobrevivência (70%) ao longo de 20 semanas após a infecção (SPI), ao passo que todo o grupo $\alpha 1,3GT$ -WT sucumbiu à infecção até 15 SPI (**Figura 1B**). Camundongos não infectados, tanto $\alpha 1,3GT$ -WT quanto $\alpha 1,3GT$ -KO, ganharam peso com o passar dos dias, contudo quando infectados, aqueles do grupo $\alpha 1,3GT$ -WT perderam uma quantidade significativamente maior de peso, iniciando desde a primeira SPI. O grupo $\alpha 1,3GT$ -KO apresentou uma perda de peso mais acentuada durante o pico de parasitemia, conseguindo retornar ao peso inicial aproximadamente 30 DPI, e ganhando peso nos dias posteriores (**Figura 1C**).

A produção de anticorpos anti- α -Gal específicos foi verificada nos grupos $\alpha 1,3GT$ -WT e $\alpha 1,3GT$ -KO infectados e não infectados pela cepa Y de *T. cruzi*. O grupo $\alpha 1,3GT$ -KO produziu títulos de anticorpos anti- α -Gal mais elevados, e esses anticorpos apresentaram alta especificidade para o epítipo α -Gal, uma vez que após tratamento com a enzima α -galactosidase, a reatividade foi drasticamente diminuída (**Figura 2**).

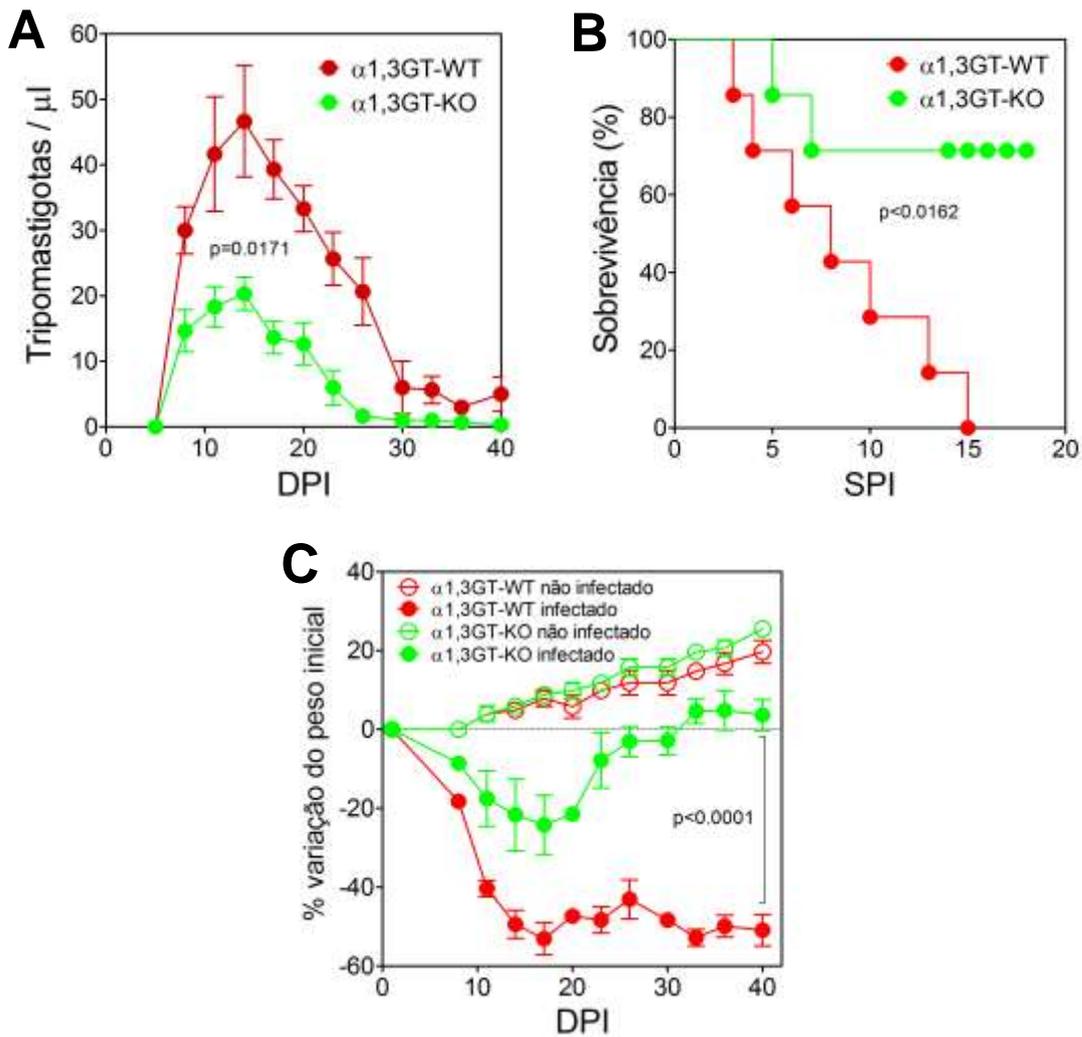


Figura 1. Parasitemia (A), sobrevivência (B) e variação do peso (C) em camundongos C57BL/6 $\alpha 1,3\text{GT-WT}$ e $\alpha 1,3\text{GT-KO}$ não infectados e infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. DPI: dias pós-infecção; SPI: semanas pós-infecção.

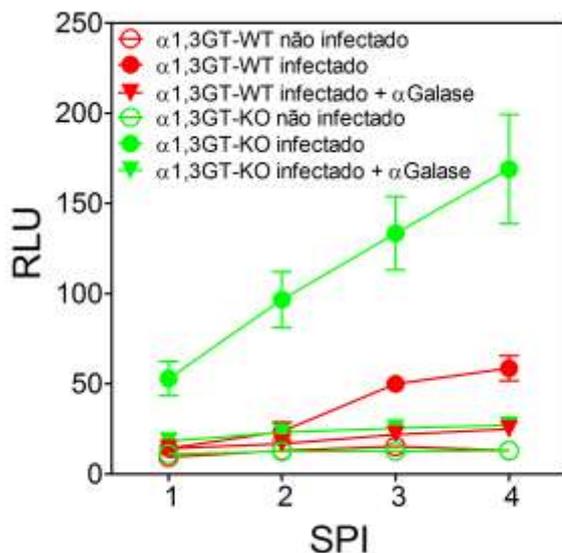


Figura 2. Reatividade do soro de camundongos C57BL/6 $\alpha 1,3\text{GT-WT}$ e $\alpha 1,3\text{GT-KO}$ não infectados e infectados pela cepa Y de *T. cruzi* frente ao antígeno Gal $\alpha 1$ -3Gal $\beta 1$ -4GlcNAc-BSA (V-Labs[®]), antes e após tratamento com a enzima α -Galactosidase. RLU: Unidades relativas de luminescência; SPI: semanas pós-infecção; αGalase : α -Galactosidase.

A produção de citocinas séricas foi avaliada semanalmente até 28 DPI. O grupo $\alpha 1,3GT$ -WT apresentou uma elevada produção de TNF- α , IFN- γ e IL-10, moderada produção de IL-2 e baixa produção de IL-4 no início da infecção. O pico das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 está associado com o aumento da parasitemia e se elevaram de forma precoce (7 DPI) Com o curso da infecção, a produção de TNF- α , IFN- γ e IL-10 nesse grupo apresentou uma diminuição acentuada, os níveis de IL-4 aumentaram a partir da terceira SPI e a produção de IL-2 se manteve constante durante as três primeiras SPI. Por outro lado, no grupo $\alpha 1,3GT$ -KO as citocinas se elevaram mais tardiamente ao longo da infecção (21-28 DPI) e com um perfil mais diversificado de elevação, caracterizado pelo aumento de todas as citocinas avaliadas (TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10) (**Figura 3**).

Em um experimento separado, os corações de ambos os grupos infectados foram removidos também semanalmente até 28 DPI e a produção das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-12 foi avaliada. O grupo $\alpha 1,3GT$ -WT apresentou uma elevada produção das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-12 no início da infecção, diminuindo nas semanas posteriores. A produção de IL-4 e IL-10 nesse grupo, no entanto, aumentou com o curso da infecção. O grupo $\alpha 1,3GT$ -KO apresentou um perfil de produção de citocinas invertido da cinética do grupo $\alpha 1,3GT$ -WT, com baixa produção de TNF- α , IFN- γ e IL-12, com elevação na produção a partir da segunda SPI, e com elevada produção de IL-4 e IL-10 no início da infecção, porém com diminuição nas semanas posteriores (**Figura 4**).

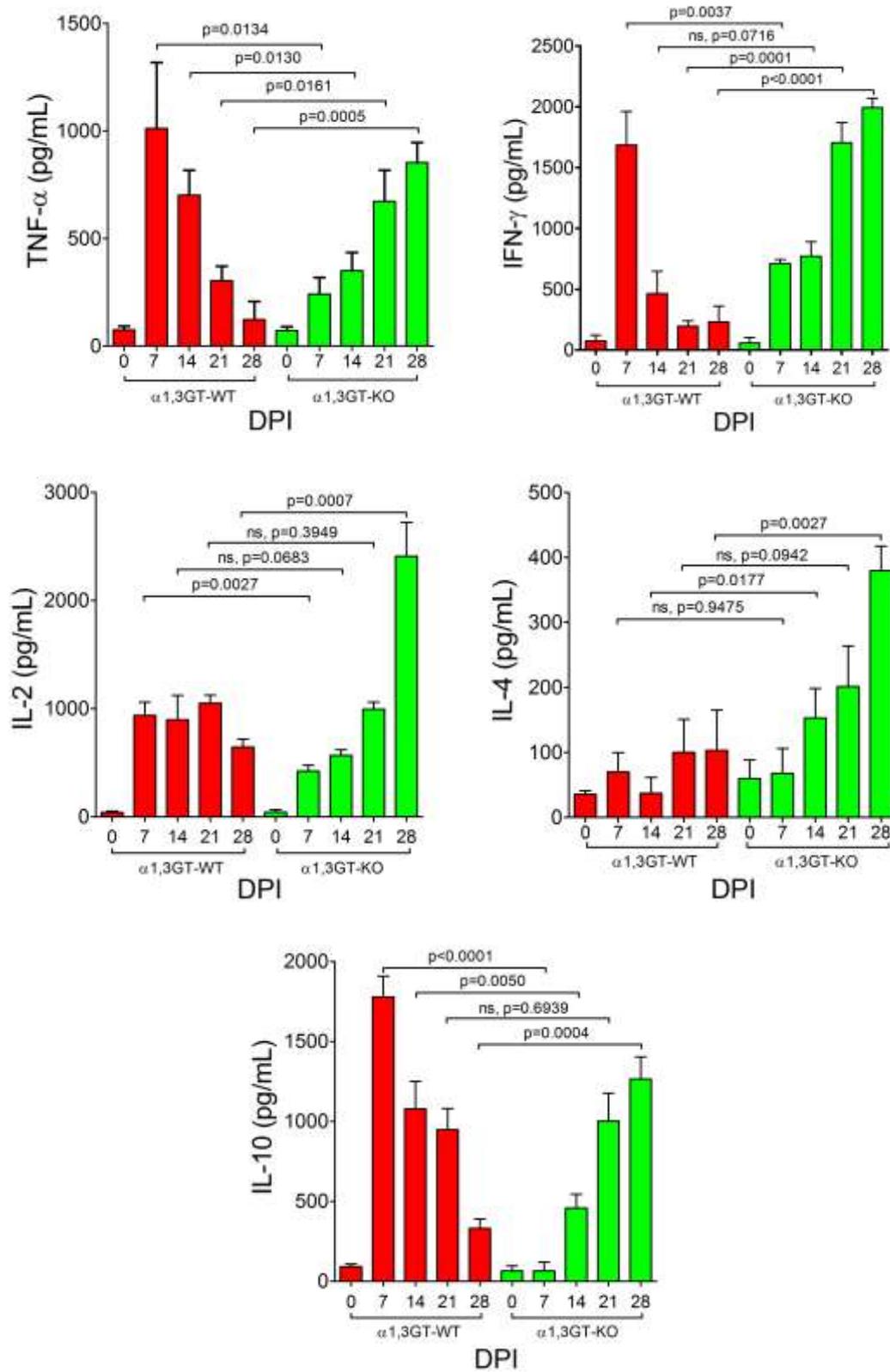


Figura 3. Produção de citocinas séricas em camundongos C57BL/6 $\alpha 1,3GT$ -WT e $\alpha 1,3GT$ -KO infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. DPI: dias pós-infecção; ns: não significativo.

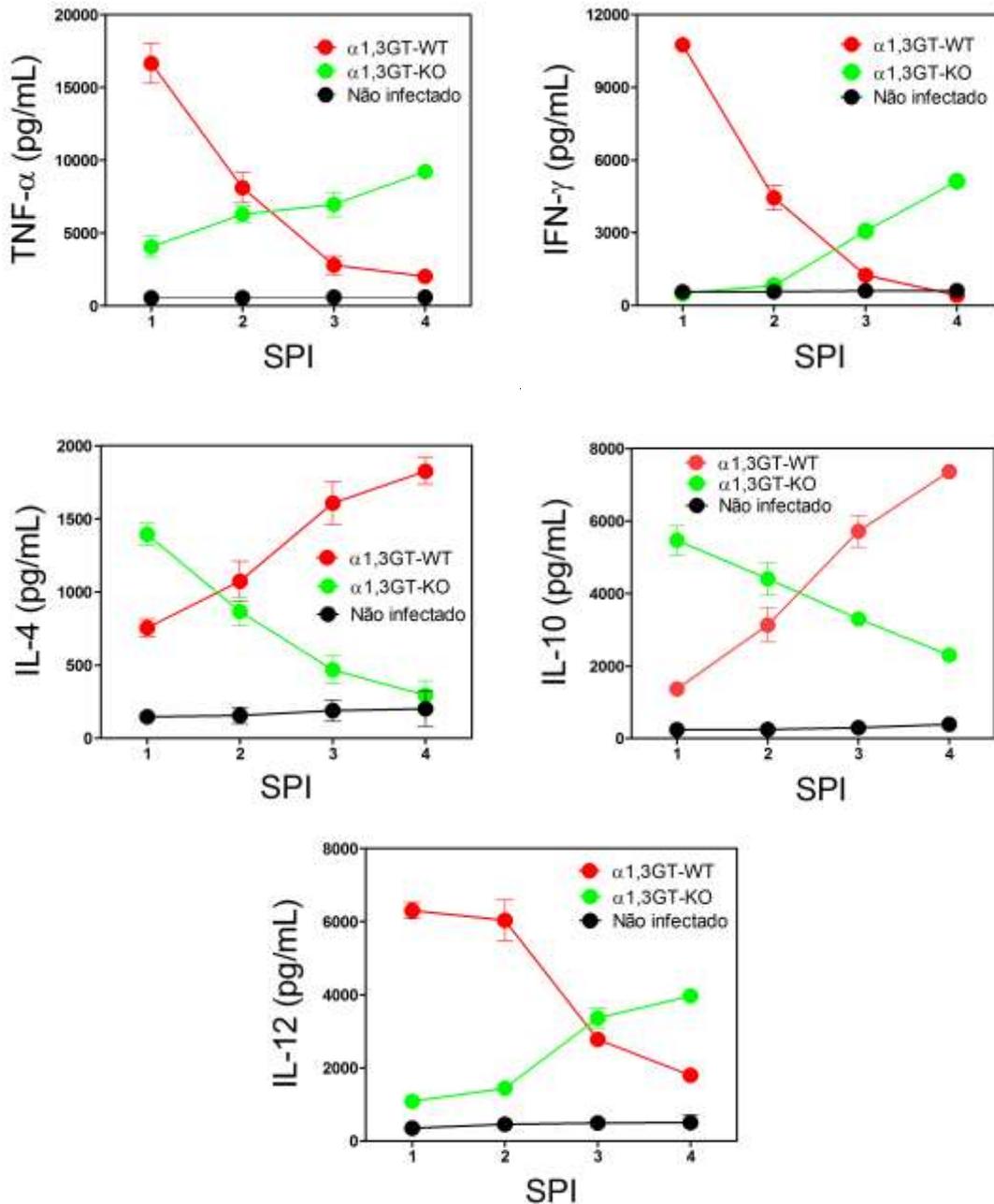


Figura 4. Produção de citocinas cardíacas em camundongos C57BL/6 α 1,3GT-WT e α 1,3GT-KO infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. SPI: semanas pós-infecção.

3.2. Produção de anticorpos líticos anti- α -Gal em camundongos α 1,3GT-KO

Devido à baixa produção de anticorpos anti- α -Gal observada em camundongos α 1,3GT-WT infectados pela cepa Y de *T. cruzi* (Figura 2), apenas camundongos α 1,3GT-KO foram utilizados neste experimento. A ação lítica desses anticorpos sobre as formas tripomastigotas do *T. cruzi*, em diferentes concentrações, foi verificada, na ausência do sistema complemento. A lise, que é caracterizada pela perda de movimento e aglutinação dos parasitos, foi evidente mesmo com baixas concentrações de anticorpo

(1 μ g/mL), porém apresentou uma elevada taxa (88%) quando a concentração foi de 100 μ g/mL (**Figura 5**).

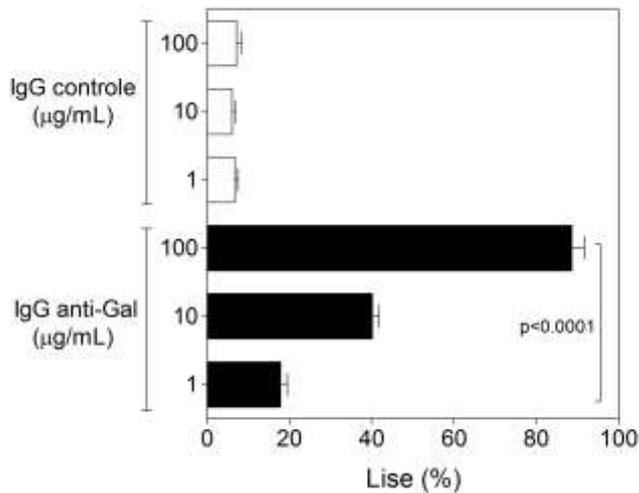


Figura 5. Percentual de lise de formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células quando incubadas com diferentes concentrações de anticorpos IgG anti- α -Gal purificados de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO infectados pela cepa Y de *T. cruzi*. IgG controle: IgG não ligada na coluna de purificação de anticorpos anti- α -Gal.

3.3. Influência *in vitro* e *in vivo* de anticorpos anti- α -Gal na infecção pelo *T. cruzi*

Células LLC-MK2 foram infectadas na proporção de 10 parasitos para uma célula, e no momento na infecção, 100 μ g de anticorpos anti- α -Gal foram adicionados ao meio de cultura. O número de parasitos encontrado no sobrenadante de células incubadas com anticorpos anti- α -Gal foi significativamente menor em comparação com as células incubadas com IgG não anti- α -Gal (IgG controle) ou sem IgG (**Figura 6A**). Após oito dias de infecção, o número de células infectadas foi contado. As células que receberam os anticorpos anti- α -Gal apresentaram diminuição significativa da infecção quando comparadas com aquelas que foram incubadas com IgG controle ou sem IgG (**Figura 6B**).

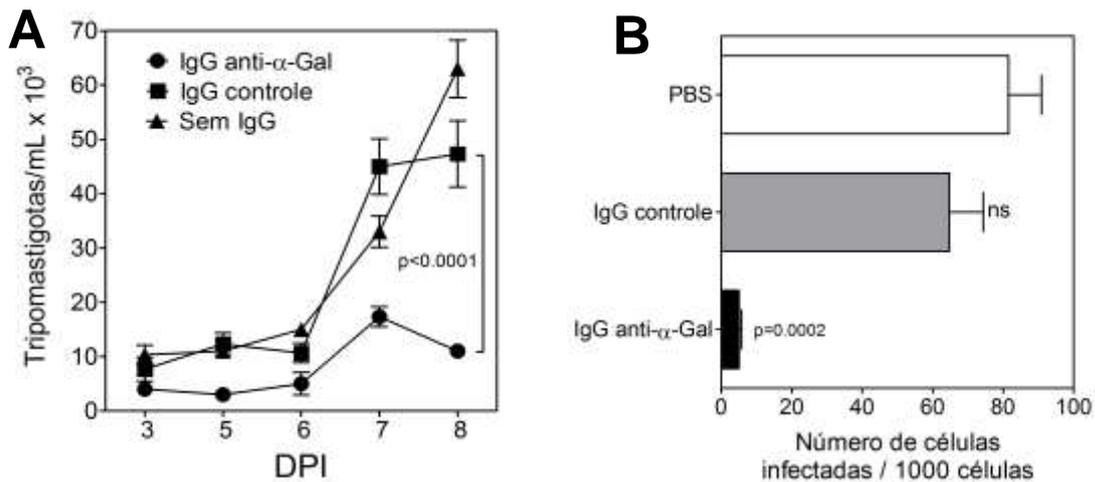


Figura 6. Quantidade de tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) encontradas no sobrenadante de cultura de células LLC-MK2 (A) e de células infectadas oito dias pós-infecção (B) após incubação ou não com 100 μ g de anticorpos IgG anti- α -Gal. IgG controle: IgG não ligada na coluna de purificação de anticorpos anti- α -Gal; DPI: dias pós-infecção; ns: não significativo.

Com o intuito de verificar a capacidade dos anticorpos anti- α -Gal em fornecer proteção para camundongos na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, um experimento *in vivo* foi realizado. Duas horas antes da infecção com a dose letal de 100.000 parasitos, 25 μ g de anticorpo anti- α -Gal purificado foram injetados através da veia caudal de cada animal. O grupo de animais que recebeu os anticorpos apresentou uma sobrevivência maior, sucumbindo à infecção 40 DPI, em contraste com os grupos que receberam PBS ou IgG controle (não anti- α -Gal), que sucumbiram à infecção 16 e 17 DPI, respectivamente (**Figura 7**).

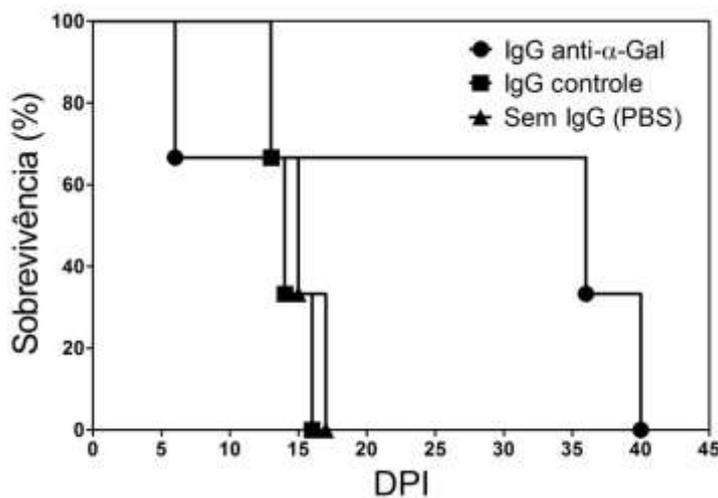


Figura 7. Percentual de sobrevivência de camundongos C57BL/6 α 1,3GT-KO infectados com 100.000 tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, duas horas após inoculação ou não de 25 μ g de anticorpos anti- α -Gal. DPI: dias pós-infecção.

4. DISCUSSÃO

A pesquisa de um modelo animal experimental adequado, que reproduza os aspectos parasitológicos e clínicos da doença de Chagas foi iniciada logo após a descoberta do *T. cruzi* em 1909. 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).

A resposta imune na infecção pelo *T. cruzi* é um fenômeno complexo, que depende do parasito, dos órgãos infectados e do tempo de infecção (RODRIGUES et al., 2016). 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). A utilização de modelos animais que se assemelhem aos seres humanos infectados pelo *T. cruzi* no tocante à resposta imune humoral e celular é fundamental para o entendimento dessa interação. Camundongos $\alpha 1,3\text{GT-KO}$ são conhecidos por não expressarem o epítopo $\alpha\text{-Gal}$ nos seus tecidos (THALL, MALÝ & LOWE, 1995; MILLAND et al., 2006), e esta particularidade faz com que, no caso da infecção pelo *T. cruzi*, esses animais sejam parcialmente semelhantes aos humanos, que também não expressam esse epítopo devido a uma perda da atividade enzimática durante o processo evolutivo (GALILI et al., 1987).

Nossos resultados mostraram que camundongos $\alpha 1,3\text{GT-KO}$ apresentam uma menor susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* quando comparados aos $\alpha 1,3\text{GT-WT}$, evidenciada pela parasitemia mais baixa, além da sobrevivência mais elevada e recuperação do peso inicial após a fase aguda da infecção. Essa baixa sobrevivência pode estar relacionada ao efeito devastador da parasitemia, gerando um processo inflamatório intenso e contribuindo para uma debilidade física generalizada, que pode ser observada, entre outros fatores, pela variação de peso durante o curso da infecção. Parte da resistência observada nesses animais pode estar associada ainda aos anticorpos específicos anti- $\alpha\text{-Gal}$ produzidos durante a infecção a partir da primeira semana, em resposta a moléculas contendo $\alpha\text{-Gal}$ que estão presentes na superfície do *T. cruzi*. Em seres humanos infectados pelo *T. cruzi* também é observado uma elevação na produção desses anticorpos, aumentando de um para cerca de 3% de anticorpo IgG anti- $\alpha\text{-Gal}$ no soro (AVILA, ROJAS & GALILI, 1989).

O perfil de citocinas dos camundongos $\alpha 1,3GT-KO$ demonstrou um melhor equilíbrio na resposta imune nas primeiras semanas de infecção, podendo ser a chave para um melhor controle da doença nesses animais, uma vez que as citocinas estão envolvidas na resistência/susceptibilidade e nos mecanismos imunopatológicos da DC (PUPULIN et al., 2016).

Os níveis séricos de IFN- γ e TNF- α foram bastante elevados na primeira semana de infecção em camundongos $\alpha 1,3GT-WT$, e alguns estudos em modelos experimentais de infecção pelo *T. cruzi* mostraram que uma resposta inflamatória robusta é desencadeada na fase aguda, com produção de citocinas inflamatórias como IFN- γ e TNF- α , que ativam células na tentativa de eliminar o parasito (TEIXEIRA, GAZZINELLI & SILVA, 2002). Este resultado sugere que, provavelmente, a liberação de citocinas por células inflamatórias é estimulada como consequência da maior quantidade de parasitos nestes animais.

Após a infecção pelo *T. cruzi*, a progressão da doença é controlada por citocinas envolvidas na ativação de macrófagos. O IFN- γ , produzido principalmente por linfócitos Th1 e células *natural killers* (NK), é uma citocina que ativa macrófagos para produzir outras citocinas protetoras, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e os metabólitos tóxicos para o parasito, como o óxido nítrico e as espécies reativas ao oxigênio (GUTIERREZ et al., 2009). O TNF- α modula moléculas de adesão que participam do recrutamento de linfócitos para os locais de inflamação (SAVINO et al., 2007). A importância do IFN- γ na resistência durante a fase aguda da infecção foi demonstrada por vários autores que relataram uma exacerbação de infecções pelo tratamento *in vivo* com anti-IFN- γ (KUEHN et al., 2014).

Durante a infecção aguda, o TNF- α isoladamente ou em associação com outras citocinas controla a multiplicação parasitária através da liberação de óxido nítrico (NO) por macrófagos (ALIBERTI et al., 1999). Contudo, já foi demonstrado também que um aumento do número de parasitos intracelulares em células tratadas com TNF- α ocorre nos primeiros momentos da infecção, corroborando a ideia de que o TNF facilita a invasão celular pelo *T. cruzi* sem efeitos aparentes na multiplicação intracelular do parasito (PINTO et al., 2011). O papel do TNF- α na infecção pelo *T. cruzi* parece então ser duplo: o controle da infecção humana e experimental do *T. cruzi* é criticamente dependente da atividade do TNF- α , mas sua superprodução é prejudicial para o hospedeiro e contribui para a patologia da doença (LANNES-VIEIRA et al., 2011).

Em modelos experimentais já foi observado que embora o TNF- α seja crucial para a regulação da cascata de citocinas que fornecem uma forma rápida de defesa do hospedeiro contra a infecção pelo *T. cruzi*, é fatal se encontrado em excesso e está intimamente associado à perda de peso, caquexia e mortalidade em animais infectados pelo *T. cruzi* (TRUYENS et al., 1995, TRUYENS et al., 1999). A produção em excesso de TNF- α em infecções por *T. cruzi* está ainda associada à hiperreatividade imune, alterações metabólicas e morte prematura de animais (HUNTER et al., 1997).

Portanto, a produção de IL-10 e outras citocinas é necessária para neutralizar os efeitos deletérios das citocinas de tipo 1 produzidas (O’GARRA & VIEIRA, 2007). Além disso, o equilíbrio entre estas citocinas é crucial para o sucesso do controle e estabelecimento da infecção. A IL-10 pode suprimir a ativação de macrófagos induzidos pelo IFN- γ enquanto inibe a liberação de metabólitos tóxicos e a diferenciação de linfócitos Th1. Essa é uma das citocinas anti-inflamatórias imune-reguladoras mais importantes, que é produzida por macrófagos e linfócitos T reguladores (PUPULIN et al., 2016).

A IL-4 apresentou uma elevação na sua produção somente em camundongos $\alpha 1,3GT-KO$ com o tempo de infecção. A IL-4 endógena induz a susceptibilidade ao *T. cruzi*, principalmente por meio da supressão da produção de IFN- γ e óxido nítrico, que possui atividade tripanocida (HIYAMA et al., 2001). Essa resposta, assim como em outras citocinas, é dependente de alguns fatores, como aqueles relacionados ao parasito. Já foi observado que, em contraste com a cepa colombiana, a cepa Y de *T. cruzi* induz níveis mais baixos de síntese de IL-4 e uma resposta imune IL-12 e IFN- γ mais dominante durante a infecção no modelo murino (MICHAJLOWSKY et al., 2001).

Com relação às amostras cardíacas, o perfil de produção de citocinas nos animais $\alpha 1,3GT-WT$ foi o mesmo para TNF- α e IFN- γ quando comparado às citocinas séricas, com maior produção na primeira semana de infecção. A produção de IL-12 também foi mais elevada na primeira semana de infecção. Uma possível razão para essa produção elevada pode ser a grande quantidade de parasitos que atingem esse órgão ainda na fase aguda. Por outro lado, o grupo $\alpha 1,3GT-KO$ aumentou ligeiramente a quantidade de TNF- α , IFN- γ e IL-12 de acordo com o tempo de infecção. Esses animais liberaram uma elevada quantidade de IL-4 e IL-10, o que poderia contribuir para promover uma resposta imune mais balanceada, resultando em uma maior resistência e

um sistema imune melhor preparado para controlar a infecção pelo *T. cruzi* na fase aguda.

O controle do *T. cruzi* depende tanto das respostas imunes inatas como adquiridas, desencadeadas durante a infecção precoce e críticas para a sobrevivência do hospedeiro, e envolvem macrófagos, células NK, linfócitos T e B e a produção de citocinas Th-1 pró-inflamatórias, tais como Como IFN- γ , TNF- α e IL-12 (MACHADO et al., 2012).

A resistência à infecção pelo *T. cruzi* tem sido associada à produção das citocinas pró-inflamatórias IL-12 e IFN- γ (RODRIGUES et al., 2016). Os camundongos $\alpha 1,3GT-WT$, embora apresentassem uma produção elevada dessas duas citocinas no coração, não foram capazes de controlar a infecção. Já foi demonstrado que a IL-12 derivada de macrófagos desempenha um papel importante no controle da parasitemia em camundongos infectados pelo *T. cruzi* e que a resistência do animal durante a fase aguda da infecção pode, pelo menos em parte, ser uma consequência dos níveis pós-infecção de IL-12 (ALIBERTI et al., 1996). Contudo, embora IL-12 ou IFN- γ sejam essenciais para a resistência do hospedeiro à infecção aguda com este parasito (MICHAILOWSKY et al., 2001), existem outros fatores que podem determinar a resistência ou susceptibilidade.

Resultados provenientes de modelos experimentais e de pesquisa em pacientes sugerem que um delicado equilíbrio entre as respostas pró e anti-inflamatórias durante a infecção aguda é necessário para impedir a proliferação descontrolada do parasito ou o desenvolvimento de uma resposta inflamatória que leva ao dano tecidual, iniciado durante a infecção aguda, que pode resultar em cardiomiopatia chagásica crônica (HOVSEPIAN et al., 2013).

A expressão de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas o TNF- α , e a citocina anti-inflamatória IL-10, medeiam a homeostase dentro do coração em resposta a lesões. No entanto, uma expressão sustentada de mediadores pró-inflamatórios em concentrações suficientemente elevadas pode levar a um desfecho adverso, incluindo insuficiência cardíaca (HOVSEPIAN et al., 2013). Por exemplo, pacientes com DC mais grave apresentaram concentrações plasmáticas elevadas de TNF- α , havendo uma boa correlação entre os níveis dessa proteína e o grau de disfunção cardíaca (TALVANI et al., 2004). Assim, níveis elevados de TNF- α em pacientes com DC crônica podem contribuir para danos nos tecidos cardíacos e mesmo CCC (LANNES-VIEIRA et al., 2011).

Durante a infecção pelo *T. cruzi*, existe um requisito crítico para a IL-10 prevenir o desenvolvimento de uma resposta imune patológica associada às células T CD4⁺ e a superprodução de IL-12 (HUNTER et al., 1997). A IL-10 foi um forte fator protetor contra a miocardite aguda fatal em um modelo de camundongo C57BL/6 na infecção pelo *T. cruzi* da cepa Colombiana (ROFFÊ et al., 2012). A baixa produção de IL-10 observada no tecido cardíaco pode ter sido fundamental para a susceptibilidade e mortalidade dos animais $\alpha 1,3GT$ -WT.

Alguns estudos indicam que as células imunes inatas, como as células NK e os macrófagos, medeiam o controle da replicação do *T. cruzi* nos estágios iniciais da infecção humana. Contudo, além do papel dessas células, a produção de anticorpos específicos parece também desempenhar uma função importante no controle precoce da parasitemia (MACHADO et al., 2012).

Camundongos $\alpha 1,3GT$ -KO apresentaram uma elevada produção de anticorpos anti- α -Gal específicos, cuja reatividade era perdida após tratamento com a enzima α -galactosidase. Esses anticorpos apresentaram uma atividade lítica acentuada e já foi demonstrado que os anticorpos líticos desempenham um papel decisivo no controle da parasitemia na infecção pelo *T. cruzi* (TRAVASSOS & ALMEIDA, 1993; KRAUTZ, KISSINGER & KRETTLI, 2000), podendo ter sido responsáveis pela eliminação de alguns parasitos circulantes nesses animais, conduzindo a uma parasitemia mais baixa e a uma maior sobrevivência.

Embora a concentração de anticorpos que apresentou um maior percentual de lise das formas tripomastigotas tenha sido relativamente alta (100 μ g/mL), uma concentração dez vezes menor (10 μ g/mL) já foi responsável pela lise de aproximadamente 40% das formas, e mesmo utilizando uma concentração 100 vezes menor (1 μ g/mL), foi possível obter um percentual de lise de 20%, demonstrando um possível efeito protetor desses anticorpos anti- α -Gal. Esses dados mostram de forma clara a eficácia do anticorpo anti- α -Gal purificado contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

Os testes *in vitro*, por meio da infecção de células LLC-MK2 concomitante com a adição de anticorpos anti- α -Gal, e *in vivo*, utilizando camundongos $\alpha 1,3GT$ -KO que receberam esses anticorpos e foram infectados com uma dose letal de tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, mostraram uma melhor proteção, visualizada pelo menor número de células infectadas e maior sobrevivência nos grupos tratados com anticorpos anti- α -Gal.

O percentual de sobrevivência poderá ser ainda maior após o aumento da concentração de anticorpos utilizada, ou mesmo pela utilização de um menor número de parasitos, uma vez que a infecção foi realizada com uma dose letal.

5. CONCLUSÕES

- Camundongos $\alpha 1,3GT$ -KO apresentam uma melhor capacidade em controlar a infecção pelo *T. cruzi*, sendo mais resistentes quando comparados aos camundongos $\alpha 1,3GT$ -WT;
- A produção de anticorpos líticos específicos anti- α -Gal pode ser um dos mecanismos responsáveis pela maior proteção encontrada nos camundongos $\alpha 1,3GT$ -KO, associada a uma resposta imune mais concatenada frente à infecção pelo *T. cruzi*;
- Anticorpos anti- α -Gal foram eficientes em diminuir o número de células infectadas pelo *T. cruzi in vitro*, e aumentar a sobrevivência de camundongos $\alpha 1,3GT$ -KO desafiados com uma dose letal de tripomastigotas da cepa Y.

4. PERSPECTIVAS

- Utilizar o antígeno $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$ frente a um painel de soro de indivíduos infectados com diferentes DTUs de *T. cruzi*; com sorologia inconclusiva pelos métodos de diagnóstico utilizados atualmente; e tratados e não tratados com benznidazol;
- Analisar amostras de banco de sangue com sorologia não negativa e amostras de infecções mistas com mais de um genótipo do *T. cruzi* utilizando o antígeno $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$;
- Avaliar a produção de anticorpos anti- $\alpha\text{-Gal}$ em camundongos $\alpha 1,3\text{GT-KO}$ previamente imunizados com o antígeno $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$;
- Realizar imunizações com o $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$ em camundongos $\alpha 1,3\text{GT-KO}$ e avaliar a proteção contra a infecção pelo *T. cruzi*;
- Avaliar a resposta imune em camundongos $\alpha 1,3\text{GT-KO}$ infectados com diferentes inóculos e DTUs de *T. cruzi*.

5. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

5.1. Artigo publicado (autor)

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

5.2. Artigos publicados (coautor)

SCHOCKER, N. S. et al. Synthesis of Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α -, Gal β (1,4)GlcNAc α - and GlcNAc-containing neoglycoproteins and their immunological evaluation in the context of Chagas disease. *Glycobiology*, v. 26, n. 1, p. 39-50, 2016.

ARAÚJO, R. N. et al. *Amblyomma sculptum* tick saliva: α -Gal identification, antibody response and possible association with red meat allergy in Brazil. *International Journal for Parasitology*, v. 46, n. 3, p. 213-220, 2016.

5.3. Artigo aceito (coautor)

Autores: Venuto, Ana; Santos, Luiza; Brito, Carlos; Valencia, Edward; Junqueira, Caroline; Filho, Adalberto; Sant'Anna, Mauricio; Gontijo, Nelder; Bartholomeu, Daniella; Fujiwara, Ricardo; Gazzinelli, Ricardo; McKay, Craig; Sanhueza, Carlos; Finn, M.G.; Marques, Alexandre.

Título: Virus-like particle display of the α -Gal carbohydrate for vaccination against *Leishmania* infection.

Revista: ACS Central Science.

5.4. Capítulo de livro em preparação (coautor)

Autores: Schocker NS,* Portillo S,* Ashmus RA, Brito CRN, Silva IE, Cordero-Mendoza Y, Marques AF, Monroy EY, Pardo A, Izquierdo I, Gállego M, Gascon J, Almeida IC,# and Michael K# (2016) (*shared first authorship; # shared senior and corresponding authorship).

Título do capítulo: Probing for *Trypanosoma cruzi* cell surface glycomarkers for the diagnosis and follow up of chemotherapy of Chagas disease. In.: Coupling and Decoupling of Diverse Molecular Units in Glycosciences.

Book editors: Zbigniew J. Witczak and Roman Bielski.

Editora: Springer.

6. REFERÊNCIAS

ABDEL-MOTAL, U. M., WIGGLESWORTH, K. & GALILI, U. 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, 2009.

ACOSTA-SERRANO, A. et al. The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 114, n. 2, p. 143-150, 2001.

ACOSTA-SERRANO, A. et al. Comparison and evolution of the surface architecture of trypanosomatid parasites. In: BARRY, D. et al. *Trypanosomes: after the genome*. Norwich: Horizon Scientific Press, 2007. p. 319-337.

ALIBERTI, J. C. S. et al. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infection and Immunity*, v. 64, n. 6, p. 1961-1967, 1996.

ALIBERTI, J. C. S. et al. β -chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbistatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*, v. 67, n. 9, p. 4819-4826, 1999.

ALMEIDA, I. C. et al. Complement-mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes by human anti-alpha-galactosyl antibodies. *Journal of Immunology*, v. 146, n. 7, p. 2394-2400, 1991.

ALMEIDA, I. C. et al. Glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*: a 74 kD antigen of trypomastigotes specifically reacts with lytic anti-alpha-galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas disease. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, v. 7, n. 6, p. 307-316, 1993.

ALMEIDA, I. C. et al. Lytic anti-alpha-galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease recognize novel O-linked oligosaccharides on mucin-like glycosyl-phosphatidylinositol-anchored glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. *The Biochemical Journal*, v. 304, n. Pt 3, p. 793-802, 1994.

ALMEIDA, I. C. et al. A highly sensitive and specific chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of active *Trypanosoma cruzi* infection. *Transfusion*, v. 37, n. 8, p. 850-857, 1997.

- ALMEIDA, I. C. et al. Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. *The EMBO Journal*, v. 19, n. 7, p. 1476-1485, 2000.
- ALVES, E. et al. Evaluation of *Plasmodium vivax* cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites as a preerythrocytic *P. vivax* vaccine. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 24, n. 4, p. 1-14, 2017.
- AMBÜHL, P. M. et al. 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, 2007.
- ANDRADE, A. L. et al. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet*, v. 348, n. 9039, p. 1407-1413, 1996.
- ANDRADE, A. L. et al. Short report: benznidazole efficacy among *Trypanosoma cruzi*-infected adolescents after a six-year follow-up. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 71, n. 5, p. 594-597, 2004.
- ANDRADE, L. O. & ANDREWS, N. W. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 200, n. 9, p. 1135-1143, 2004.
- ANDRADE, L. O. & ANDREWS, N. W. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nature Reviews. Microbiology*, v. 3, n. 10, p. 819-823, 2005.
- ANDREWS, N. W. & COLLI, W. Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. *The Journal of Protozoology*, v. 29, n. 2, p. 264-269, 1982.
- ANRAKU, K. et al. The design and synthesis of an α -Gal trisaccharide epitope that provides a highly specific anti-Gal immune response. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 15, n. 14, p. 2979-2992, 2017.
- ARAÚJO, F. G. Analysis of *Trypanosoma cruzi* antigens bound by specific antibodies and by antibodies to related trypanosomatids. *Infection and Immunity*, v. 53, n. 1, p. 179-185, 1986.
- ARAÚJO, R. N. et al. *Amblyomma sculptum* tick saliva: α -Gal identification, antibody response and possible association with red meat allergy in Brazil. *International Journal for Parasitology*, v. 46, n. 3, p. 213-220, 2016.

- ASHCROFT, A. E. et al. Engineering thermal stability in RNA phage capsids via disulphide bonds. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 5, n. 12, p. 2034-2041, 2005.
- ASHMUS, R. A. et al. 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, 2013.
- ATASSI, M. Z. et al. Immune recognition of serum albumin-XIV. Cross-reactivity by T-lymphocyte proliferation of subdomains 3, 6 and 9 of bovine serum albumin. *Molecular Immunology*, v. 19, n. 2, p. 313-321, 1982.
- AVILA, J. L., ROJAS, M. & GALILI, U. 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, 1989.
- BALOUZ, V., AGÜERO, F. & BUSCAGLIA, C. A. Chagas disease diagnostic applications: present knowledge and future steps. *Advances in Parasitology*, v. 97, p. 1-45, 2017.
- BARRETT, M. P. et al. The trypanosomiases. *The Lancet*, v. 362, n. 9394, p. 1469-1480, 2003.
- BASSO, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. *World Journal of Experimental Medicine*, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2013.
- BERMUDEZ, J. et al. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Tropica*, v. 156, p. 1-16, 2016.
- BERN, C. & MONTGOMERY, S. P. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. *Clinical Infectious Disease*, v. 49, n. 5, p. e52-e54, 2009.
- BERN, C. et al. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 24, n. 4, p. 655-681, 2011.
- BERN, C. Chagas' Disease. *The New England Journal of Medicine*, v. 373, n. 5, p. 456-466, 2015.
- BLANKEN, W. M. & VAN den EIJDEN, D. H. Biosynthesis of terminal Gal alpha 1-3Gal 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, 1985.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Consenso Brasileiro em doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 38, supl. III, p. 1-29, 2005.
- BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 4, n. 6, p. 389-396, 1962.
- BRETAÑA, A. et al. 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, 1992.
- BRITO, C. R. N. et al. Virus-like particle display of the α -Gal epitope for the diagnostic assessment of Chagas disease. *ACS Infectious Diseases*, v. 2, n. 12, p. 917-922, 2016.
- BROWN, S. D., FIEDLER, J. D. & FINN, M. G. Assembly of hybrid bacteriophage Q β virus-like particles. *Biochemistry*, v. 48, n. 47, p. 11155-11157, 2009.
- BUSCAGLIA, C. A. et al. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nature Reviews. Microbiology*, v. 4, n. 3, p. 229-236, 2006.
- CABALLERO, Z. C. et al. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 14, n. 8, p. 1045-1049, 2007.
- CANTEY, P. T. et al. The United States *Trypanosoma cruzi* Infection Study: evidence for vector-borne transmission of the parasite that causes Chagas disease among United States blood donors. *Transfusion*, v. 52, n. 9, p. 1922-1930, 2012.
- CÂMARA, A. C. J. et al. Genetic analyses of *Trypanosoma cruzi* isolates from naturally infected triatomines and humans in northeastern Brazil. *Acta Tropica*, v. 115, n. 3, p. 205-211, 2010.
- CHIANG, T. R. et al. Anti-Gal antibodies in humans and 1, 3 α -galactosyltransferase knock-out mice. *Transplantation*, v. 69, n. 12, p. 2593-2600, 2000.

- CHIARI, E. et al. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 22, n. 1, p. 19-23, 1989.
- CHUNG, C. H. et al. Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *The New England Journal of Medicine*, v. 358, n. 11, p. 1109-1117, 2008.
- CORNUZ, J. et al. A Vaccine against nicotine for smoking cessation: a randomized controlled trial. *PLoS One*, v. 3, n. 6, p. 1-10, 2008.
- COURA, J. R. & VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, v. 465, n. 7301, p. S6-7, 2010.
- COWAN, P. J. & d'APICE, A. J. F. Galactose- α 1,3-galactose knockout mouse: a surrogate recipient. *Current Opinion in Organ Transplantation*, v. 8, n. 1, p. 70-75, 2003.
- DAHL, K. et al. 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, 2006.
- De MARCHI, C. R. et al. Evaluation of a recombinant *Trypanosoma cruzi* mucin-like antigen for serodiagnosis of Chagas' disease. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 18, n. 11, p. 1850-1855, 2011.
- De PABLOS, L. M. & OSUNA, A. Multigene families in *Trypanosoma cruzi* and their role in infectivity. *Infection and Immunity*, v. 80, n. 7, p. 2258-2264, 2012.
- DERIY, L. et al. *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, 2005.
- DIAS, J. C. et al. 2nd Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 49, suppl. 1, p. 3-60, 2016.
- DUMONTEIL, E. & HERRERA, C. Ten years of Chagas disease research: looking back to achievements, looking ahead to challenges. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 4, p. 1-5, 2017.

- FERNÁNDEZ-TEJADA, A., CAÑADA, F. J. & JIMÉNEZ-BARBERO, J. Recent developments in synthetic carbohydrate-based diagnostics, vaccines, and therapeutics. *Chemistry*, v. 21, n. 30, p. 10616-10628, 2015.
- FERREIRA, R. C. et al. Colonization of *Rhodnius prolixus* gut by *Trypanosoma cruzi* involves an extensive parasite killing. *Parasitology*, v. 143, n. 4, p. 434-443, 2016.
- FIEDLER, J. D. et al. RNA-directed packaging of enzymes within virus-like particles. *Angewandte Chemie*, v. 49, n. 50, p. 9648-9651, 2010.
- FIEDLER, J. D. et al. Engineered mutations change the structure and stability of a virus-like particle. *Biomacromolecules*, v. 13, n. 8, p. 2339-2348, 2012.
- FULURIJA, A. et al. Vaccination against GIP for the treatment of obesity. *PLoS One*, v. 3, n. 9, p. 1-11, 2008.
- FURUCHÓ, C. R. et al. Inconclusive results in conventional serological screening for Chagas' disease in blood banks: evaluation of cellular and humoral response. *Tropical Medicine & International Health*, v. 13, n. 12, p. 1527-1533, 2008.
- GALILI, U. et al. A unique natural human IgG antibody with anti-alpha-galactosyl specificity. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 160, n. 5, p. 1519-1531, 1984.
- GALILI, U. et al. 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, 1985.
- GALILI, U. et al. Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal α 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, 1987.
- GALILI, U. et al. 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, 1988a.
- GALILI, U. et al. Interaction between human natural anti-alpha-galactosyl immunoglobulin G and bacteria of the human flora. *Infection and Immunity*, v. 56, n. 7, p. 1730-1737, 1988b.
- GALILI, U. The natural anti-Gal antibody: evolution and autoimmunity in man. *Immunology Series*, v. 55, p. 355-373, 1991.

- GALILI, U. Evolution and pathophysiology of the human natural anti- α -galactosyl IgG (anti-Gal) antibody. *Springer Seminars in Immunopathology*, v. 15, n. 2, p. 155-171, 1993a.
- GALILI, U. 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, 1993b.
- GALILI, U. et al. One percent of human circulating B lymphocytes are capable of producing the natural anti-gal antibody. *Blood*, v. 82, n. 8, p. 2485-2493, 1993.
- GALILI, U. et al. The natural anti-Gal antibody. *Sub-cellular Biochemistry*, v. 32, p. 79-106, 1999.
- GALILI, U., WIGGLESWORTH, K. & ABDEL-MOTAL, U. M. 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, 2010.
- GALILI, U. Anti-Gal: an abundant human natural antibody of multiple pathogenesis and clinical benefits. *Immunology*, v. 140, n. 1, p. 1-11, 2013.
- GALILI, U. Significance of the evolutionary α 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, 2015.
- GALILI, U. α -Gal Nanoparticles in wound and burn healing acceleration. *Advances in Wound Care*, v. 6, n. 3, p. 81-92, 2017.
- GALVÃO, L. M. C. et al. Lytic antibody titre as a means of assessing cure after treatment of Chagas disease: a 10 years follow-up study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 87, n. 2, p. 220-223, 1993.
- GARCIA, M. N. et al. Evidence of autochthonous Chagas disease in southeastern Texas. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 92, n. 2, p. 325-330, 2015.
- GAZZINELLI, R. T. et al. 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, 1991.

- GOLGHER, D. & GAZZINELLI, R. T. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. *Autoimmunity*, v. 37, n. 5, p. 399-409, 2004.
- GONZÁLEZ, J. et al. Niveles de anticuerpos anti-Gal em personas infectadas y no-infectadas por *Trypanosoma cruzi*: probable inducción por bacterias y por el parásito. *Boletín Chileno de Parasitología*, v. 50, n. 1/2, p. 3-9, 1995.
- GUTIERREZ, F. R. et al. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, Suppl 1, p. 236-245, 2009.
- GUZMÁN-GOMEZ, D. et al. Highly discordant serology against *Trypanosoma cruzi* in central Veracruz, Mexico: role of the antigen used for diagnostic. *Parasites & Vectors*, v. 8, n. 466, p. 1-8, 2015.
- HIYAMA, K. et al. IL-4 reduces resistance of mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology Research*, v. 87, n. 4, p. 269-274, 2001.
- HONG, V. et al. Analysis and optimization of copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition for bioconjugation. *Angewandte Chemie*, v. 48, n. 52, p. 9879-9883, 2009.
- HOVLID, M. R. et al. Encapsidated atom-transfer radical polymerization in Q β virus-like nanoparticles. *ACS Nano*, v. 8, n. 8, p. 8003-8014, 2014.
- HOVSEPIAN, E. et al. IL-10 inhibits the NF- κ B and ERK/MAPK-mediated production of pro-inflammatory mediators by up-regulation of SOCS-3 in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes. *PLoS One*, v. 8, n. 11, p. e79445, 2013.
- HUNTER, C. A. et al. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Immunology*, v. 158, n. 7, p. 3311-3316, 1997.
- IZQUIERDO, L. et al. Evaluation of a chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in a nonendemic setting. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 7, p. 928-931, 2013.
- JAZÍN, E. E. et al. Shift of excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* during human Chagas' disease. *Infection and Immunity*, v. 59, n. 6, p. 2189-2191, 1991.

- JIMENEZ, V. Dealing with environmental challenges: mechanisms of adaptation in *Trypanosoma cruzi*. *Research in Microbiology*, v. 165, n. 3, p. 155-165, 2014.
- JOHNSON, H. R. et al. Solubilization and stabilization of bacteriophage MS2 in organic solvents. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 97, n. 2, p.224-234, 2007.
- KELLER, S. A. et al. 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, 2010.
- KHAN, F. et al. Head-to-head comparison of soluble vs. Q β VLP circumsporozoite protein vaccines reveals selective enhancement of NANP repeat responses. *PLoS One*, v. 10, n. 11, p. 1-18, 2015.
- KOZLOVSKA, T. M. et al. Recombinant RNA phage Q beta capsid particles synthesized and self-assembled in *Escherichia coli*. *Gene*, v. 137, n. 1, p. 133-137, 1993.
- KRAUTZ, G. M., KISSINGER, J. C. & KRETTLI, A. U. The targets of the lytic antibody response against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*, v. 16, n. 1, p. 31-34, 2000.
- KUEHN, C. C. et al. Distinctive histopathology and modulation of cytokine production during oral and intraperitoneal *Trypanosoma cruzi* Y strain infection. *Parasitology*, v. 141, n. 7, p. 904-913, 2014.
- LANNES-VIEIRA, J. et al. TNF- α and TNFR in Chagas disease: from protective immunity to pathogenesis of chronic cardiomyopathy. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 691, p. 221-230, 2011.
- LANTÉRI, M. et al. A complete alpha1,3-galactosyltransferase gene is present in the human genome and partially transcribed. *Glycobiology*, v. 12, n. 12, p. 785-792, 2002.
- LANTOS, A. B. et al. Sialic acid glycobiochemistry unveils *Trypanosoma cruzi* trypomastigote membrane physiology. *PLoS Pathogens*, v. 12, n. 4, p. 1-29, 2016.
- LaTEMPLE, D. C. & GALILI, U. Adult and neonatal anti-Gal response in knock-out mice for alpha1,3galactosyltransferase. *Xenotransplantation*, v. 5, n. 3, p. 191-196, 1998.

- LEDERKREMER, R. M & AGUSTI, R. Glycobiology of *Trypanosoma cruzi*. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, v. 62, p. 311-366, 2009.
- LOGANATHAN, D. et al. Immobilized *Marasmius oreades* agglutinin: use for binding and isolation of glycoproteins containing the xenotransplantation or human type B epitopes. *Glycobiology*, v. 13, n. 12, p. 955-960, 2003.
- LOW, J. G. et al. 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*, v. 32, n. 39, p. 5041-5048, 2014.
- LUQUETTI, A. O. et al. Chagas' disease diagnosis: a multicentric evaluation of Chagas Stat-Pak, a rapid immunochromatographic assay with recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 46, n. 4, p. 265-271, 2003.
- MACHADO, F. S. et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Seminars in Immunopathology*, v. 34, n. 6, p. 753-770, 2012.
- MACHADO-SILVA, A. et al. How *Trypanosoma cruzi* deals with oxidative stress: antioxidant defence and DNA repair pathways. *Mutation Research. Reviews in Mutation Research*, v. 767, p. 8-22, 2016.
- MACHER, B. A. & GALILI, U. The Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc-R (α -Gal) epitope: a carbohydrate of unique evolution and clinical relevance. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1780, n. 2, p. 75-88, 2008.
- MAKELA, O. & SEPPALA, I. J. T. Haptens and carriers. In: WEIR, D. M. Handbook of experimental immunology in four volumes. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1986.
- MALCHIODI, E. L. et al. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag163B6). *Clinical and Experimental Immunology*, v. 97, n. 3, p. 417-423, 1994.
- MANNE-GOEHLER, J. et al. Estimating the burden of Chagas disease in the United States. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 11, p. 1-7, 2016.

- MAURER, P. et al. A therapeutic vaccine for nicotine dependence: preclinical efficacy, and Phase I safety and immunogenicity. *European Journal of Immunology*, v. 35, n. 7, p. 2031-2040, 2005.
- MAURER, P. & BACHMANN, M. F. Therapeutic vaccines for nicotine dependence. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, v. 8, n. 1, p. 11-6, 2006.
- McCONVILLE, M. J. et al. Secretory pathway of trypanosomatid parasites. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, v. 66, n. 1, p. 122-154, 2002.
- MELO, M. F. et al. Usefulness of real time PCR to quantify parasite load in serum samples from chronic Chagas disease patients. *Parasites & Vectors*, v. 8, n. 154, p. 1-7, 2015.
- MICHAILOWSKY, V. et al. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. *The American Journal of Pathology*, v. 159, n. 5, p. 1723-1733, 2001.
- MILLAND, J. et al. The molecular basis for galalpha(1,3)gal expression in animals with a deletion of the alpha1,3galactosyltransferase gene. *Journal of Immunology*, v. 176, n. 4, p. 2448-2454, 2006.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Recomendações sobre o diagnóstico parasitológico, sorológico e molecular para confirmação da doença de Chagas aguda e crônica. *Revista de Patologia Tropical*, v. 42, n. 4, p. 475-478, 2013.
- MINNING, T. A. et al. The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics*, v. 10, n. 370, p. 1-15, 2009.
- MONCAYO, A. & SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, supl. 1, p. 17-30, 2009.
- MORILLO, C. A. et al. Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine*, v. 373, n. 14, p. 1295-1306, 2015.
- MOURE, Z. et al. Serodiscordance in chronic Chagas disease diagnosis: a real problem in non-endemic countries. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 22, n. 9, p. 788-792, 2016.

- NOGUEIRA, N. P. et al. Proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi* inside its vector have a new trigger: redox status. *PloS One*, v. 10, n. 2, p. 1-16, 2015.
- NUNES, M. C. et al. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 62, n. 9, p. 767-776, 2013.
- O’GARRA, A. & VIEIRA, P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nature Reviews. Immunology*, v. 7, n. 6, p. 425-428, 2007.
- OPAS – Organização Panamericana de Saúde. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las américas. Washington:OPAS, 2006.
- OTANI, M. M. et al. WHO comparative evaluation of serologic assays for Chagas disease. *Transfusion*, v. 49, n. 6, p. 1076-1082, 2009.
- PATEL, K. G. & SWARTZ, J. R. Surface functionalization of virus-like particles by direct conjugation using azide-alkyne click chemistry. *Bioconjugate Chemistry*, v. 22, n. 3, p. 376-387, 2011.
- 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.
- PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. et al. Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti-alpha-galactosyl antibodies. *Journal of Cell Science*, v. 113, n. Pt7, p. 1299-1307, 2000.
- PINAZO, M. J. et al. Altered hypercoagulability factors in patients with chronic Chagas disease: potential biomarkers of therapeutic response. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2016.
- PINGEL, S. et al. Purification and characterization of an alpha-galactosyltransferase from *Trypanosoma brucei*. *The Biochemical Journal*, v. 338, n. pt2, p. 545-551, 1999.
- PINTO, A. M. T. et al. Tumour necrosis factor (TNF)-mediated NF-κB activation facilitates cellular invasion of non-professional phagocytic epithelial cell lines by *Trypanosoma cruzi*. *Cellular Microbiology*, v. 13, n. 10, p. 1518-1529, 2011.
- POSEKANY, K. J. et al. Suppression of Lewis lung tumor development in alpha 1,3 galactosyltransferase knock-out mice. *Anticancer Research*, v. 24, n. 2B, p. 605-612, 2004.

- PREVIATO, J. O. et al. O-glycosidically linked N-acetylglucosamine-bound oligosaccharides from glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. *The Biochemical Journal*, v. 301, Pt. 1, p. 151-159, 1994.
- PUPULIN, A. R. et al. Canova medication changes TNF- α and IL-10 serum levels in mice infected with *Trypanosoma cruzi* Y strain. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 9, n. 9, p. 860-865, 2016.
- RAMASAMY, R & RAJAKARUNA, R. Association of malaria with inactivation of alpha1,3-galactosyl transferase in catarrhines. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1360, n. 3, p. 241-246, 1997.
- RAMÍREZ, J. C. et al. Analytical validation of quantitative Real-Time PCR methods for quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *The Journal of Molecular Diagnostics*, v. 17, n. 5, p. 605-615, 2015.
- RASSI JR, A., RASSI, A. & MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. *Lancet*, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.
- RASSI JR, A., RASSI, A. & REZENDE, J. M. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 26, n. 2, p. 275-291, 2012.
- RHEE, J. et al. Glycan-targeted virus-like nanoparticles for photodynamic therapy. *Biomacromolecules*, v. 13, n. 8, p. 2333-2338, 2012.
- ROCHA, M. O., RIBEIRO, A. L. & TEIXEIRA, M. M. Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. *Frontiers in Bioscience*, v. 8, p. e44-48, 2003.
- ROCHA, M. O., TEIXEIRA, M. M. & RIBEIRO, A. L. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 5, n. 4, p. 727-743, 2007.
- RODRIGUES, A. A. et al. A high throughput analysis of cytokines and chemokines expression during the course of *Trypanosoma cruzi* experimental oral infection. *Acta Tropica*, v. 157, p. 42-53, 2016.
- ROFFÊ, E. et al. IL-10 limits parasite burden and protects against fatal myocarditis in a mouse model of *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Immunology*, v. 188, n. 2, p. 649-660, 2012.

- ROSSI, G. R. et al. 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, 2005.
- ROSSI, G. R. et al. 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, 2008.
- ROTHER, R. P. & SQUINTO, S. P. The alpha-galactosyl epitope: a sugar coating that makes viruses and cells unpalatable. *Cell*, v. 86, n. 2, p. 185-188, 1996.
- RUIZ, R. C. et al. The 35/50 kDa surface antigen of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes, an adhesion molecule involved in host cell invasion. *Parasite Immunology*, v. 15, n. 2, p. 121-125, 1993.
- SALDAÑA, A. & SOUSA, O. E. *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*: cross-reaction among their immunogenic components. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 91, n. 1, p. 81-82, 1996.
- SANTOS, F. L. N. et al. Accuracy of chimeric proteins in the serological diagnosis of chronic chagas disease - a Phase II study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 3, p. 1-20, 2017.
- SAVINO, W. et al. Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 18, n. 1-2, p. 107-124, 2007.
- SCHNAIDMAN, B. B. et al. Cross-reactive polysaccharides from *Trypanosoma cruzi* and fungi (especially *Dactylium dendroides*). *The Journal of Protozoology*, v. 33, n. 2, p. 186-191, 1986.
- SCHOCKER, N. S. et al. Synthesis of Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α -, Gal β (1,4)GlcNAc α - and GlcNAc-containing neoglycoproteins and their immunological evaluation in the context of Chagas disease. *Glycobiology*, v. 26, n. 1, p. 39-50, 2016.
- SCHWARZ, B. & DOUGLAS, T. Development of virus-like particles for diagnostic and prophylactic biomedical applications. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v. 7, n. 5, p. 722-735, 2015.

- SILVEIRA, J.F., UMEZAWA E. S. & LUQUETTI, A. O. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends in Parasitology*, v. 17, n. 6, p. 286-291, 2001.
- SOARES, R. P. et al. Intraspecies variation in *Trypanosoma cruzi* GPI-mucins: biological activities and differential expression of α -galactosyl residues. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 87, n. 1, p. 87-96, 2012.
- SOUTO, R. P. et al. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 83, n. 2, p. 141-152, 1996.
- SOUTO-PADRON, T. et al. 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, 1994.
- SPOHN, G. et al. 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, 2007.
- TALVANI, A. et al. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. *Clinical Infectious Diseases*, v. 38, n. 7, p. 943-950, 2004.
- TARDIEUX, I. et al. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell*, v. 71, n. 7, p. 1117-1130, 1992.
- TEARLE, R. G. et al. The alpha-1,3-galactosyltransferase knockout mouse. Implications for xenotransplantation. *Transplantation*, v. 61, n. 1, p. 13-9, 1996.
- TEIXEIRA, M. M., GAZZINELLI, R. T. & SILVA, J. S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends in Parasitology*, v. 18, n. 6, p. 262-265, 2002.
- THALL, A. D., MALÝ, P. & LOWE, J. B. 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, 1995.
- THORLACIUS-USSING, L. et al. Proteomic analysis of tissue from α 1,3-galactosyltransferase knockout mice reveals that a wide variety of proteins and protein fragments change expression level. *PLoS One*, v. 8, n. 11, p. 1-10, 2013.

- TISSOT, A. C. et al. A VLP-based vaccine against interleukin-1 α protects mice from atherosclerosis. *European Journal of Immunology*, v. 43, n. 3, p. 716-722, 2013.
- TORRECILHAS, A. C. T. et al. *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. *Microbes and Infection*, v. 11, n. 1, p. 29-39, 2009.
- TOWBIN, H. et al. Circulating antibodies to mouse laminin in Chagas disease, American cutaneous leishmaniasis, and normal individuals recognize terminal galactosyl(α 1-3)-galactose epitopes. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 166, n. 2, p. 419-432, 1987.
- TRAVASSOS, L. R. & ALMEIDA, I. C. Carbohydrate immunity in American trypanosomiasis. *Springer Seminars in Immunopathology*, v. 15, n. 2-3, p. 183-204, 1993.
- TRUYENS, C. et al. The cachexia associated with *Trypanosoma cruzi* acute infection in mice is attenuated by anti-TNF- α , but not by anti-IL-6 or anti-IFN- γ antibodies. *Parasite Immunology*, v. 17, n. 11, p. 561-568, 1995.
- TRUYENS, C. et al. The endogenous balance of soluble tumor necrosis factor receptors and tumor necrosis factor modulates cachexia and mortality in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*, v. 67, n. 11, p. 5579-5586, 1999.
- TYLER, K. M. & ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*, v. 31, n. 5-6, p. 472-481, 2001.
- UMEZAWA, E. S., SHIKANAI-YASUDA, M. A. & STOLF, A. M. Changes in isotype composition and antigen recognition of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies from acute to chronic Chagas disease. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, v. 10, n. 6, p. 407-413, 1996.
- UMEZAWA, E. S., NASCIMENTO, M. S., STOLF, A. M. Enzyme-linked immunosorbent assay with *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens (TESA-ELISA) for serodiagnosis of acute and chronic Chagas' disease. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 39, n. 3, p. 169-176, 2001.
- UNFER, R. C., HELLRUNG, D. & LINK Jr, C. J. Immunity to the α (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, 2003.
- VILLALTA, F. & KIERSZENBAUM, F. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: role of cell surface galactose residues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 119, n. 1, p. 228-235, 1984.
- VIOTTI, R. et al. Towards a paradigm shift in the treatment of chronic Chagas disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 2, p. 635-639, 2014.
- WHO. Control of Chagas disease. *World Health Organization Technical Report Series*, v. 905, p. 1-109, 2002.
- WHO. Department of Control of Neglected Tropical Diseases. Sustaining the Drive to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases: Second Who Report on Neglected Diseases. WHO, 2013. 140 p.
- WHO. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected diseases 2015. Geneva: WHO, 2015a.
- WHO. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Weekly Epidemiological Record*, v. 90, n. 6, p. 33-43, 2015b.
- WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact sheet n° 340. Updated March 2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em: 22 jul. 2017.
- WIGGLESWORTH, K. M. et al. Rapid recruitment and activation of macrophages by anti-Gal/ α -Gal liposome interaction accelerates wound healing. *Journal of Immunology*, v. 186, n. 7, p. 4422-4432, 2011.
- WILKINSON, S. G. Bacterial lipopolysaccharides – themes and variations. *Progress in Lipid Research*, v. 35, n. 3, p. 283-343, 1996.
- WINTER, H. C., MOSTAFAPOUR, K. & GOLDSTEIN, I. J. The mushroom *Marasmius oreades* lectin is a blood group type B agglutinin that recognizes the Gal α 1,3Gal and Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc porcine xenotransplantation epitopes with high affinity. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 17, p. 14996-15000, 2002.

- WOOLSEY, A. M. et al. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *Journal of Cell Science*, v. 116, n. Pt17, p. 3611-3622, 2003.
- YILMAZ, B. et al. Gut microbiota elicits a protective immune response against malaria transmission. *Cell*, v. 159, n. 6, p. 1277-1289, 2014.
- YIN, Z. et al. Boosting immunity to small tumor-associated carbohydrates with bacteriophage q β capsids. *ACS Chemical Biology*, v. 8, n. 6, p. 1253-1262, 2013.
- YOSHIDA, N. et al. Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*, v. 57, n. 6, p. 1663-1667, 1989.
- ZARATE-BLADES, C. R. et al. Diagnostic performance of tests based on *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens in an endemic area for Chagas' disease in Bolivia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 57, n. 2, p. 229-232, 2007.
- ZINGALES, B. et al. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *International Journal for Parasitology*, v. 28, n. 1, p. 105-112, 1998.
- ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 7, p. 1051-1054, 2009.
- ZINGALES, B. et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 12, n. 2, p. 240-253, 2012.

7. ANEXOS

7.1. ANEXO 1

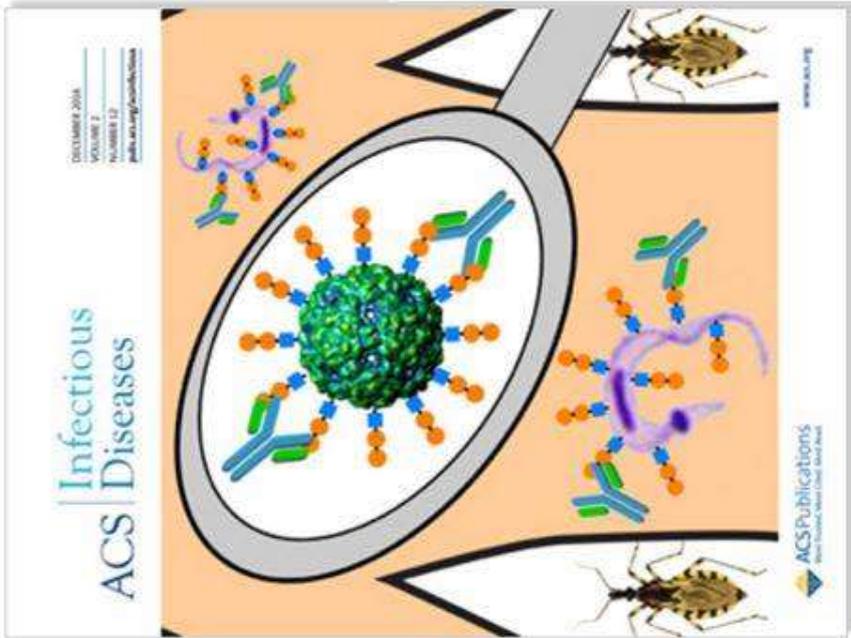
Artigo publicado na *Glycobiology* (2016):

SCHOCKER, N. S. et al. Synthesis of Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α -, Gal β (1,4)GlcNAc α - and GlcNAc-containing neoglycoproteins and their immunological evaluation in the context of Chagas disease. *Glycobiology*, v. 26, n. 1, p. 39-50, 2016.

7.2. ANEXO 2

Capa da revista e artigo publicado na ACS Infectious Disease (2016):

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



December 9, 2016
Volume 2, Issue 12
Pages 892-979

About the Cover:
Diagnostic assessment of Chagas disease may be improved with protein nanoparticles decorated with the immunogenic α -Gal trisaccharide. These particles allow for the sensitive and selective detection of antibodies generated as a result of *Trypanosoma cruzi* infection, the disease-causing parasite that also displays this molecule, transmitted by the "kissing bug" vector.

Infectious Diseases
ACS Publications
pubs.acs.org/journal/infdis

Virus-like Particle Display of the α -Gal Epitope for the Diagnostic Assessment of Chagas Disease

Carlos Ramon Nascimento Brito,¹ Craig S. McKay,² Maira Araújo Azevedo,³ Luiza Costa Brandão Santos,¹ Ana Paula Venuto,¹ Daniela Ferreira Nunes,¹ Daniella Alchaar D'Ávila,¹ Giselle Macedo Rodrigues da Cunha,¹ Igor Correia Almeida,¹ Ricardo Tostes Gazzinelli,¹ Lucía María Cunha Galvão,¹ Egler Chiani,¹ Carlos A. Sanhueza,⁴ M. G. Finn,^{5,6} and Alexandre Ferreira Marques^{6*}

¹Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

²Baylor Biomedical Research Center, Department of Biological Sciences, University of Texas at El Paso, El Paso, Texas 79912, United States

³School of Chemistry and Biochemistry, Georgia Institute of Technology, Atlanta, Georgia 30332, United States

7.3. ANEXO 3

Aprovação do projeto pelo CEUA- UFMG

 UFMG	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 α 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 α 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 certificate 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 - cetea@prpq.ufmg.br	

Glycan Synthesis

Synthesis of Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α -, Gal β (1,4)GlcNAc α - and GlcNAc-containing neoglycoproteins and their immunological evaluation in the context of Chagas disease

Nathaniel S Schocker², Susana Portillo³, Carlos R N Brito^{3,4}, Alexandre F Marques⁴, Igor C Almeida³, and Katja Michael^{1,2}

²Department of Chemistry, ³Department of Biological Sciences, Border Biomedical Research Center, University of Texas at El Paso, 500 W. University Ave., El Paso, TX 79968, USA, and ⁴Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

¹To whom correspondence should be addressed: Tel: +1-915-747-5240; e-mail: kmichael@utep.edu

Received 29 June 2015; Revised 9 September 2015; Accepted 9 September 2015

Abstract

The protozoan parasite, *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease (ChD), has a cell surface covered by immunogenic glycoconjugates. One of the immunodominant glycotopes, the trisaccharide Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α , is expressed on glycosylphosphatidylinositol-anchored mucins of the infective trypomastigote stage of *T. cruzi* and triggers high levels of protective anti- α -Gal antibodies (Abs) in infected individuals. Here, we have efficiently synthesized the mercaptopropyl glycoside of that glycotope and conjugated it to maleimide-derivatized bovine serum albumin (BSA). Chemiluminescent-enzyme-linked immunosorbent assay revealed that Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α -BSA is recognized by purified anti- α -Gal Abs from chronic ChD patients ~230-fold more strongly than by anti- α -Gal Abs from sera of healthy individuals (NHS anti- α -Gal). Similarly, the pooled sera of chronic Chagas disease patients (ChHSP) recognized Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α ~20-fold more strongly than pooled NHS. In contrast, the underlying disaccharide Gal β (1,4)GlcNAc α and the monosaccharide GlcNAc α or GlcNAc β conjugated to BSA are poorly or not recognized by purified anti- α -Gal Abs or sera from Chagasic patients or healthy individuals. Our results highlight the importance of the terminal Gal α moiety for recognition by Ch anti- α -Gal Abs and the lack of Abs against nonself Gal β (1,4)GlcNAc α and GlcNAc α glycotopes. The substantial difference in binding of Ch vs. NHS anti- α -Gal Abs to Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α -BSA suggests that this neoglycoprotein (NGP) might be suitable for experimental vaccination. To this end, the Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α -BSA NGP was then used to immunize α 1,3-galactosyltransferase-knockout mice, which produced antibody titers 40-fold higher as compared with pre-immunization titers. Taken together, our results indicate that the synthetic Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α glycotope coupled to a carrier protein could be a potential diagnostic and vaccine candidate for ChD.

Key words: biomarkers, carbohydrates, Chagas disease, immunization, neoglycoprotein

Introduction

The surface of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease (ChD), is heavily coated by glycoproteins containing highly immunogenic glycans (Travassos and Almeida 1993; Acosta-Serrano et al. 2007). An immunodominant glycotope, Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α , is abundantly expressed in the mammal-dwelling *T. cruzi* trypomastigote stage (Almeida et al. 1994) and is not expressed on human cells, thus it is highly immunogenic to humans (Travassos and Almeida 1993; Macher and Galili 2008). The Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α epitope contains a terminal, non-reducing α Gal residue, which is highly conserved on trypomastigote-derived GPI-mucins (tGPI-mucins) of at least four major *T. cruzi* genotypes causing ChD in humans: TcI, TcII, TcV and TcVI (Almeida et al. 1993; Travassos and Almeida 1993; Soares et al. 2012; Izquierdo et al. 2013). The Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α glycotope contains the disaccharide Gal α 1,3Gal β , which is strongly recognized by Chagasic (Ch) anti- α -Gal Abs and to a much lesser extent by the natural anti- α -Gal Abs from healthy individuals (NHS anti- α -Gal) (Almeida et al. 1994; Ashmus et al. 2013), which are produced mainly against gram-negative enterobacteria of the human flora (Galili et al. 1999). These enterobacteria (e.g., *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Klebsiella* spp. and *Citrobacter* spp.) have various types of non-reducing, terminal α -Gal-linked glycans, mostly Gal α 1,2-R, Gal α 1,4-R and Gal α 1,6-R (where R is the remaining side chain or core glycan) on the lipopolysaccharide (LPS) core oligosaccharides or O-antigens (Wilkinson 1996). The glycotope Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α , so far not reported in enterobacteria, and most likely other yet unidentified *T. cruzi*-specific cell surface saccharides with terminal α Gal moieties, induce the major lytic, protective antibodies (Ch anti- α -Gal Abs) produced during both the acute and chronic stages of ChD (Milani and Travassos 1988; Avila et al. 1989; Almeida et al. 1991, 1994; Gazzinelli et al. 1991; Travassos and Almeida 1993). These studies strongly indicate that lytic Ch anti- α -Gal Abs could be one of the main immunological mechanisms for controlling the parasitemia in both stages of the disease in humans. Thus, Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α offers a potential route toward a carbohydrate-based vaccine against ChD. Glycoconjugates are still unexplored as vaccine targets in *T. cruzi*, although these molecules are the most abundant and immunogenic antigens on the plasma membrane of all *T. cruzi* developmental stages (Frasch 2000; Buscaglia et al. 2004; Acosta-Serrano et al. 2007).

Here we describe the synthesis of glycosides of Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α , and its truncated versions Gal β (1,4)GlcNAc α and GlcNAc α , as well as its diastereomer GlcNAc β , all equipped with a thiol functionality (glycosides 1–4, Figure 1) for their conjugation to the carrier protein bovine serum albumin (BSA). All neoglycoproteins (NGPs) were immunologically evaluated by chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay (CL-ELISA) (Almeida et al. 1997), using purified Ch anti- α -Gal Abs vs. NHS anti- α -Gal Abs, and Ch human serum pool (ChHSP) vs. normal human serum pool (NHSP). Lastly, the NGP Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α -BSA was used to immunize α 1,3-galactosyltransferase-knockout (α 1,3-GalT-KO) mice, which do not express terminal α Gal epitopes in their cells (Tearle et al. 1996; Thall et al. 1996). These animals are able to produce lytic anti- α -Gal Abs, mimicking therefore the human humoral immune response against *T. cruzi* (Almeida et al. unpublished data).

The production of the trisaccharide Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α and related analogs has been previously accomplished for a variety of uses, and mostly involves chemoenzymatic syntheses (Vic et al. 1997; Fang et al. 1998; Qian et al. 1999; Brinkmann et al. 2001), which are often efficient. However, some research groups prefer its chemical synthesis due to reagent availability, scalability and derivatization options. For example, α -Gal trisaccharides have been chemically synthesized and coupled to Sepharose (Dahmén et al. 2002), attached to a lipid for non-covalent association to target molecules (Litjens et al. 2005) or attached to linkers such as *p*-nitrophenol esters (Plaza-Alexander and Lowary 2013) and 3-aminopropyl groups (Hanessian et al. 2001; Wang et al. 2005) to allow for further functionalization.

The four key features of our approach to an Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α -containing NGP are as follows: (i) predominant use of acyl protecting groups that can be easily installed and cleanly removed; (ii) utilization of Kiso's 4,6-di-*tert*-butylsilyl protected galactosyl donor (Imamura et al. 2006) to ensure a stereoselective α -galactosylation; (iii) utilization of easily accessible monosaccharide building blocks and (iv) use of an allyl glycoside at the non-reducing end of the trisaccharide allowing for the installation of a thiol functional group, via a thiol-ene reaction, for covalent conjugation to a carrier protein. Implementing these features, our strategy involves the synthesis of an acyl-protected disaccharide (Gal α 1,3Gal β), its conversion into a trichloroacetimidate donor, glycosylation of an appropriate allyl glycoside GlcNAc acceptor to produce a

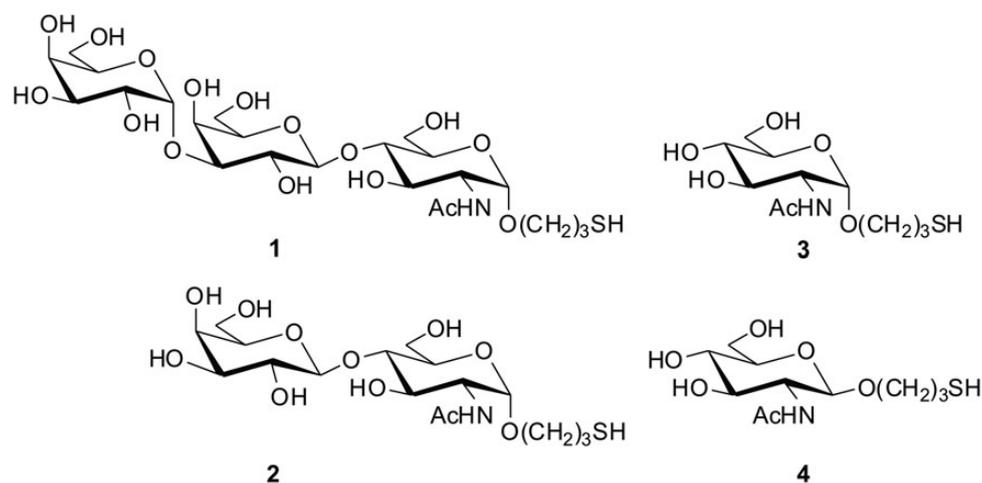


Fig. 1. Target mercaptopropyl saccharides of Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α (1), Gal β (1,4)GlcNAc α (2), GlcNAc α (3) and GlcNAc β (4).

Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α allyl glycoside and further derivatization into a mercaptopropyl glycoside needed for protein conjugation.

BSA was chosen for the generation of NGPs because of its large number of conjugation sites per BSA molecule, its superior solubility properties and its suitability as a carrier protein (Makela and Seppala 1986) and provider of T cell epitopes for the immunization of mice (Atassi et al. 1982), as well as its capability to attach non-covalently to wells of microtiter plates. Previously, we discovered that Ch anti- α -Gal Abs recognize the disaccharide Gal α (1,3)Gal β , which comprises the two terminal sugars of the glycotope trisaccharide Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α , much more strongly than Gal α alone (Ashmus et al. 2013). In order to obtain information on the importance of Gal β (1,4)GlcNAc α or GlcNAc for antibody recognition, three additional BSA NPGs containing Gal β 1,4GlcNAc α , GlcNAc α or GlcNAc β were synthesized and tested by CL-ELISA.

Results and discussion

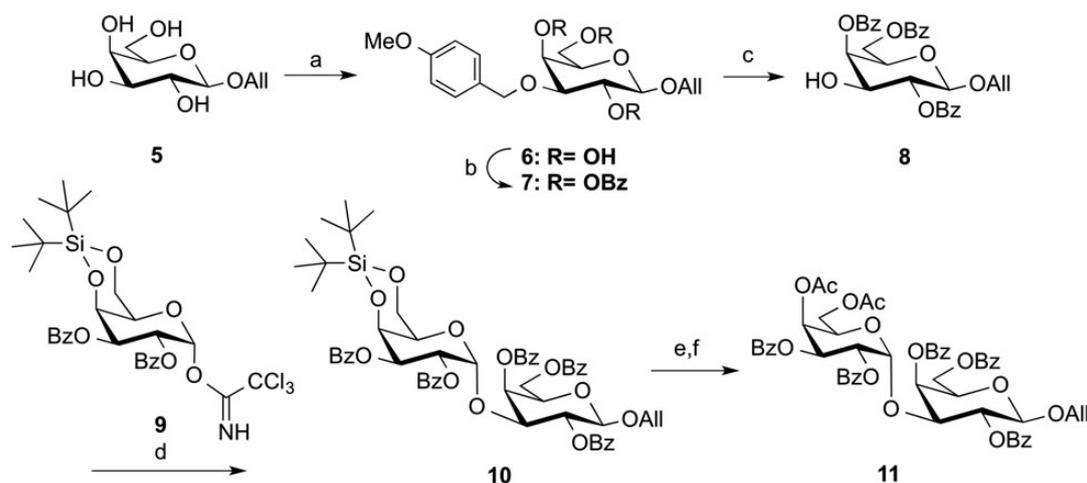
The α -Gal disaccharide **11** was synthesized from the known allyl β -galactoside **5** (Stevenson and Furneaux 1996), which was made from its peracetylated precursor following an optimized procedure (Khamis et al. 2012). Disaccharide **11** was synthesized in a 55% overall yield, starting with *p*-methoxybenzoylation of allyl glycoside **5** at position 3 via its tin acetal to give **6**, followed by benzoylation of the three remaining hydroxyls to afford **7**. Oxidative cleavage of the *p*-methoxybenzyl (PMB) group with 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) furnished the β -Gal acceptor **8**. This acceptor was glycosylated with the known di-*tert*-butylsilylidene equipped α -Gal trichloroacetimidate donor **9** (Imamura et al. 2006), using trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (TMS-OTf) catalysis to give disaccharide **10**. The di-*tert*-butylsilylidene group was cleaved with a large excess of 70% hydrogen fluoride in pyridine (HF-pyr) in tetrahydrofuran (THF), followed by acetylation of the two hydroxyls to give the peracetylated allyl disaccharide **11** (Scheme 1).

The α -Gal disaccharide **11** was then treated with palladium(II) chloride in methanol to give the hemiacetal, which was filtered immediately after consumption of the starting material to avoid the formation of a polar by-product that we observed after 2 h of reaction, and converted into the trichloroacetimidate **12** with trichloroacetonitrile in the presence of 1,8-diazabicycloundec-7-ene (DBU) (Scheme 2). This

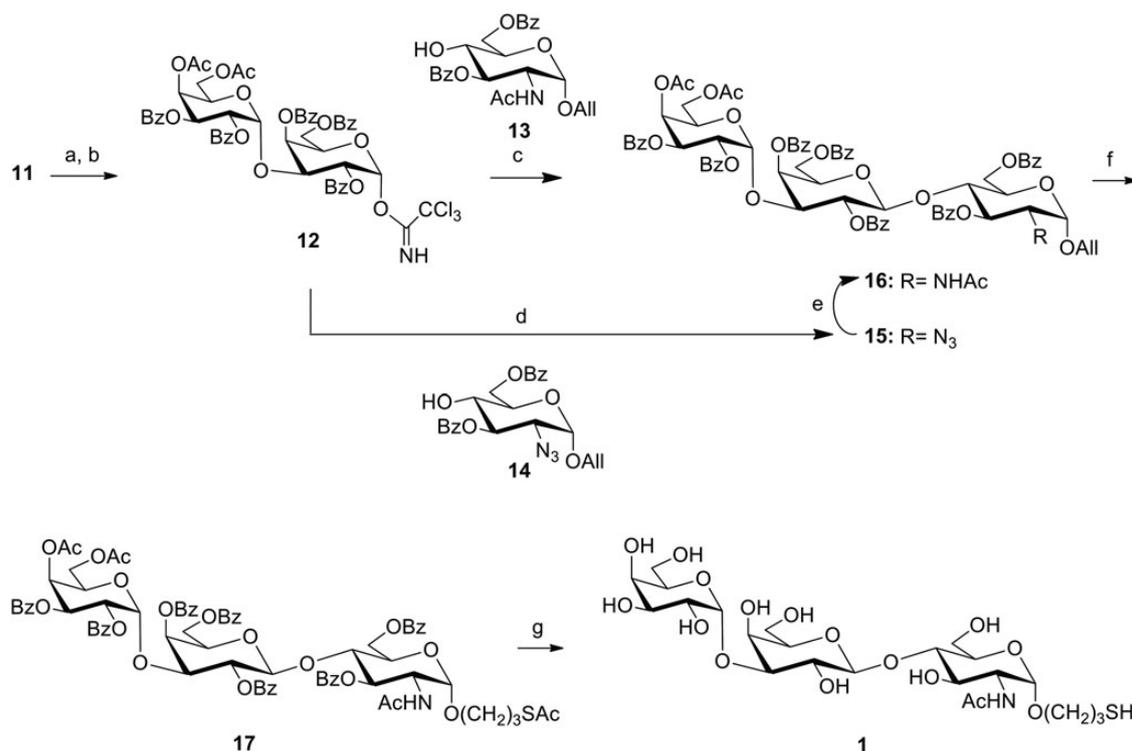
donor was first used to glycosylate the allyl GlcNAc acceptor **13** with TMS-OTf, but produced a low-yielding mixture of anomers (1:4 α/β) likely due to the well-known poor nucleophilicity of the 4-OH of GlcNAc acceptors (Crich and Dudkin 2001). The separation of the two diastereomeric trisaccharides proved to be difficult but could be accomplished by reversed-phase fast protein liquid chromatography (FPLC). Replacing the acceptor **13** by the allyl 2-deoxy-2-azido-Glc acceptor **14** produced trisaccharide **15** in 46% yield, which could be purified by flash chromatography, and the azide was then reduced to an *N*-acetyl group with neat thioacetic acid (AcSH) to give the trisaccharide **16**. Radical addition of AcSH with azobisisobutyronitrile (AIBN) in THF under UV light gave the thioester **17**, followed by saponification under Zemplén conditions to afford the target trisaccharide **1** (Scheme 2).

The Gal β (1,4)GlcNAc α disaccharide **2** was synthesized as shown in Scheme 3 in a 70% overall yield from the allyl GlcNAc acceptor **13**. Through the use of a large excess of the known acetylated trichloroacetimidate β -Gal donor **18** (Schmidt and Michel 1980) and the use of boron trifluoride etherate (BF₃-Et₂O) at an unusual elevated temperature (Hendel et al. 2009), the Gal β (1,4)GlcNAc α disaccharide **19** was obtained in high yield (83%), followed by radical addition of AcSH to give the thioester **20**. Saponification under Zemplén conditions cleanly gave the target disaccharide **2**. The mercaptopropyl glycoside of GlcNAc α (**3**) was synthesized as previously described (Houseman et al. 2003), while the mercaptopropyl glycoside of GlcNAc β (**4**) was synthesized by radical addition of AcSH to the known allyl glycoside **21** (Kiso and Anderson 1979) to give thioester **22**, followed by saponification to provide the target glycoside **4** (Scheme 3).

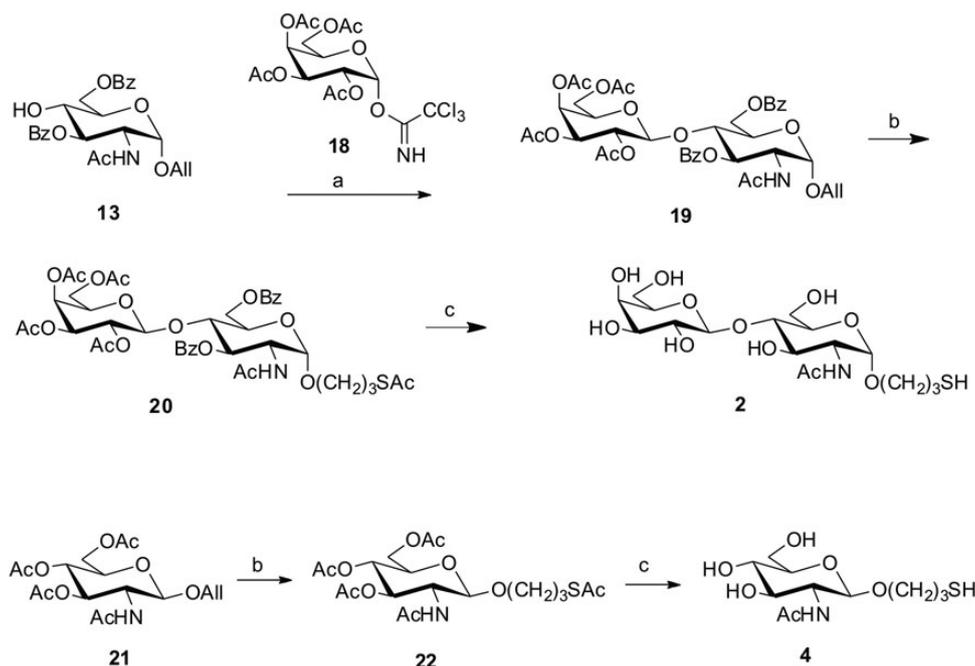
The mercaptopropyl glycosides oxidized to disulfides within hours–days of isolation, which could easily be reduced by tris (2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) before their conjugation to BSA. The thiol groups on compounds **1–4** served as nucleophiles in the conjugate addition to commercially available maleimide-derivatized BSA in aqueous buffer at pH 7.2, as shown in Figure 2. This produced NGPs via thioether linkages, and the average number of saccharides conjugated per BSA molecule was estimated by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. The conjugation of 22–23 units of Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α and 23–24 units of Gal β (1,4)GlcNAc α per molecule of BSA are shown in Figure 2. An average of 29 units of GlcNAc α and 25 units of GlcNAc β were conjugated to BSA (see Supplementary data, p. S3).



Scheme 1. Synthesis of disaccharide **11**. a: Bu₂SnO, MeOH, reflux; PMB-Cl, Bu₄NBr, benzene, reflux (75%); b: BzCl, pyr (91%); c: DDQ, CH₂Cl₂/H₂O (98%); d: TMS-OTf, DCM, 0°C, molecular sieves 4 Å (92%); e: HF-pyr, THF and f: Ac₂O, pyr (89%, 2 steps).



Scheme 2. Synthesis of mercaptopropyl trisaccharide **1**. a: PdCl₂, MeOH (87%); b: CCl₃CN, DBU, CH₂Cl₂ (84%); c: TMS-OTf, molecular sieves 4 Å, CH₂Cl₂ (30% of 1:4 α/β anomers, FPLC separable); d: TMS-OTf, molecular sieves 4 Å, CH₂Cl₂ (46%); e: AcSH (77%); f: AcSH, AIBN, THF, UV light (350 nm) (89%) and g: NaOMe, MeOH (quant.).



Scheme 3. Synthesis of mercaptopropyl glycosides **2** and **4**. a: BF₃·Et₂O, CH₂Cl₂, 35–40°C (83%); b: AcSH, AIBN, THF, UV light (350 nm) (84–85%) and c: NaOMe, MeOH (quant.).

The four NPGs, Galα(1,3)Galβ(1,4)GlcNAcα-BSA, Galβ(1,4)GlcNAcα-BSA, GlcNAcα-BSA, GlcNAcβ-BSA, and a BSA control conjugate in which the maleimide groups had been blocked with cysteine (Cys-BSA) were immobilized in 96-well polystyrene Nunc

Maxisorp ELISA plates and antibody-binding responses were measured using CL-ELISA (Almeida et al. 1997), with pooled Chagasic human sera (ChHSP) and normal human sera (NHSP), as well as Ch anti-α-Gal Abs and NHS anti-α-Gal Abs, purified as described

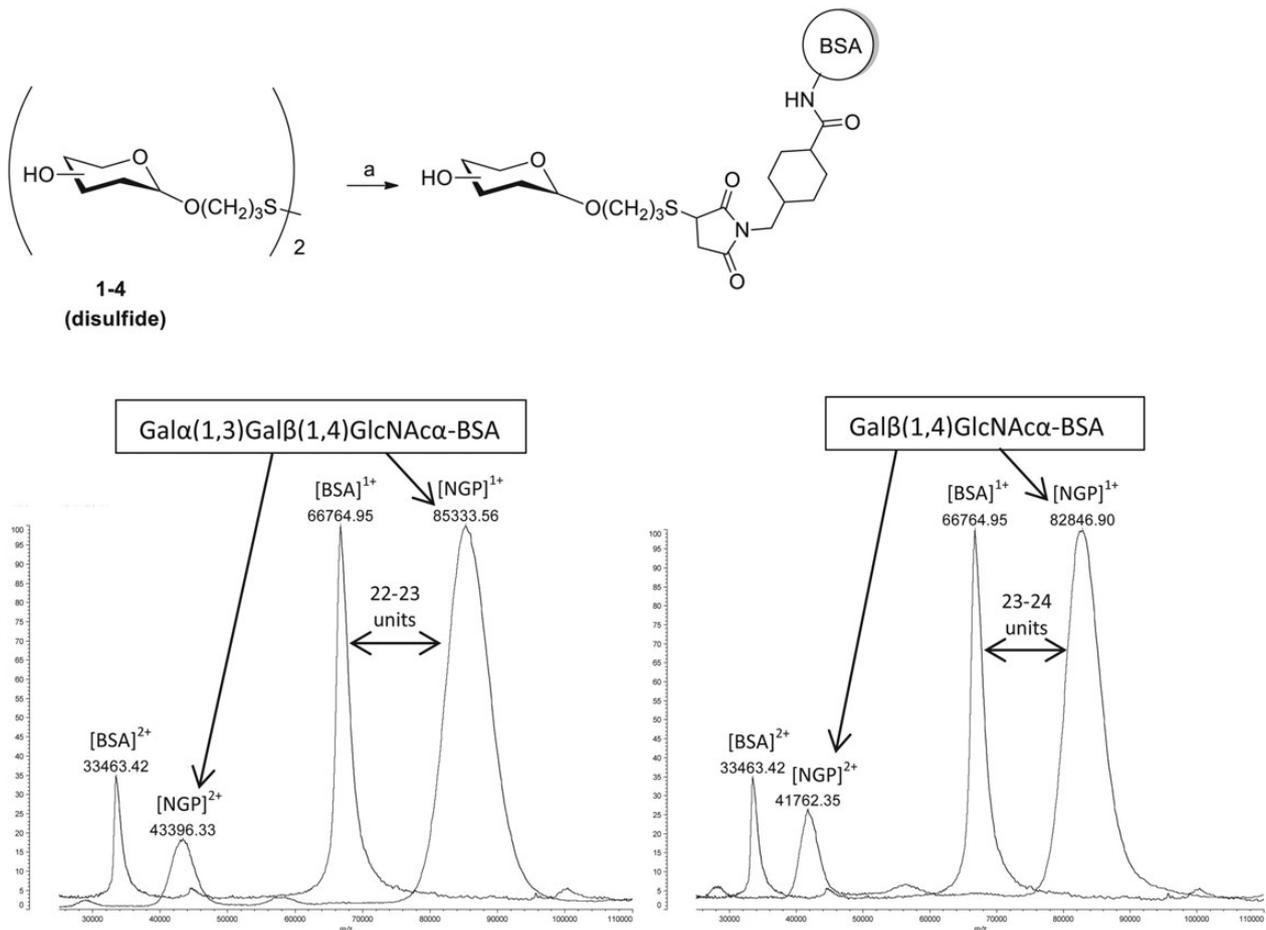


Fig. 2. (Top) Schematic representation of conjugation of NGPs to BSA. a: Tris-(2-carboxyethyl)phosphine, phosphate buffer pH 7.2 and maleimide-activated BSA. (Bottom left and right) MALDI-TOF mass spectra of Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α -BSA and Gal β (1,4)GlcNAc α -BSA, respectively.

(Almeida et al. 1991). As shown in Figure 3A, Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α -BSA clearly displays a 20-fold differential between ChHSP and NHSP, whereas the NGPs Gal β (1,4)GlcNAc α -BSA, GlcNAc α -BSA and GlcNAc β -BSA all show minimal binding to either pooled sera. There was no significant difference between the weak antibody reactivity observed with GlcNAc α and GlcNAc β . Cys-BSA proved to be an effective negative control. As shown in Figure 3B, Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α -BSA displays a 230-fold differential between purified Ch and NHS anti- α -Gal Abs, while NGPs Gal β (1,4)GlcNAc α -BSA, GlcNAc α -BSA and GlcNAc β -BSA are practically not recognized by either Abs. These results emphasize that the terminal Gal α residue is crucial for Ch antibody binding and demonstrates a convenient method to differentiate between *T. cruzi*-infected and non-infected sera. In addition, they show that although Gal β (1,4)GlcNAc α and GlcNAc α are nonself glycotopes for humans, there is little or no antibody response against them in the sera of Ch patients (Figure. 3A).

Next, the *in vivo* response to Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α -BSA was evaluated in C57Bl/6 α 1,3-galactosyltransferase-knockout (α 1,3-GalT-KO) mice. Akin to humans and in contrast to wild-type mice, these animals lack terminal Gal α 1,3-linked residues on glycoproteins, thus being able to produce high levels of anti- α -Gal Abs (Tearle et al. 1996; Thall et al. 1996). Sera collected from immunized and control animals were pooled separately and analyzed by CL-ELISA (Ashmus et al. 2013). As shown in Figure 4, sera from the Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α -BSA-immunized mice displayed a 22-fold higher antibody

response to Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α -BSA after immunization as compared with pre-immunization levels, whereas mice immunized with BSA alone showed minimal antibody reactivity before and after immunization.

In conclusion, the mercaptopropyl glycoside of Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α was efficiently synthesized in 12 steps from known monosaccharide building blocks. In contrast to the published chemical syntheses, an important feature of this synthesis is the ease of accessibility of the glycosyl acceptors, which are synthesized in only two or three steps from commercially available starting materials. In addition, our synthesis utilizes common and inexpensive glycosylation catalysts. The two key steps in this synthesis are the stereoselective installation of the terminal Gal α unit into disaccharide 10 in 92% yield, and the challenging glycosylation of the 2-deoxy-2-azido acceptor 14 to give the correct stereoisomer (trisaccharide 15) in 46% yield. With the exception of the PMB group introduced into galactose derivative 6, the di-*tert*-butylsilylidene protecting group of the galactosyl donor 9, and the allyl group as a precursor of a hemiacetal in compound 11, easily installable and removable acetyl and benzoyl protecting groups were used throughout the synthesis. Utilizing anomeric allyl groups allowed for the convenient conversion into mercaptopropyl glycosides that were needed for the conjugation to maleimide-derivatized BSA. The mercaptopropyl group of these glycosides is highly versatile as it is suitable for the conjugation to a large variety of other biomolecules and surfaces by conjugate addition to maleimides, nucleophilic

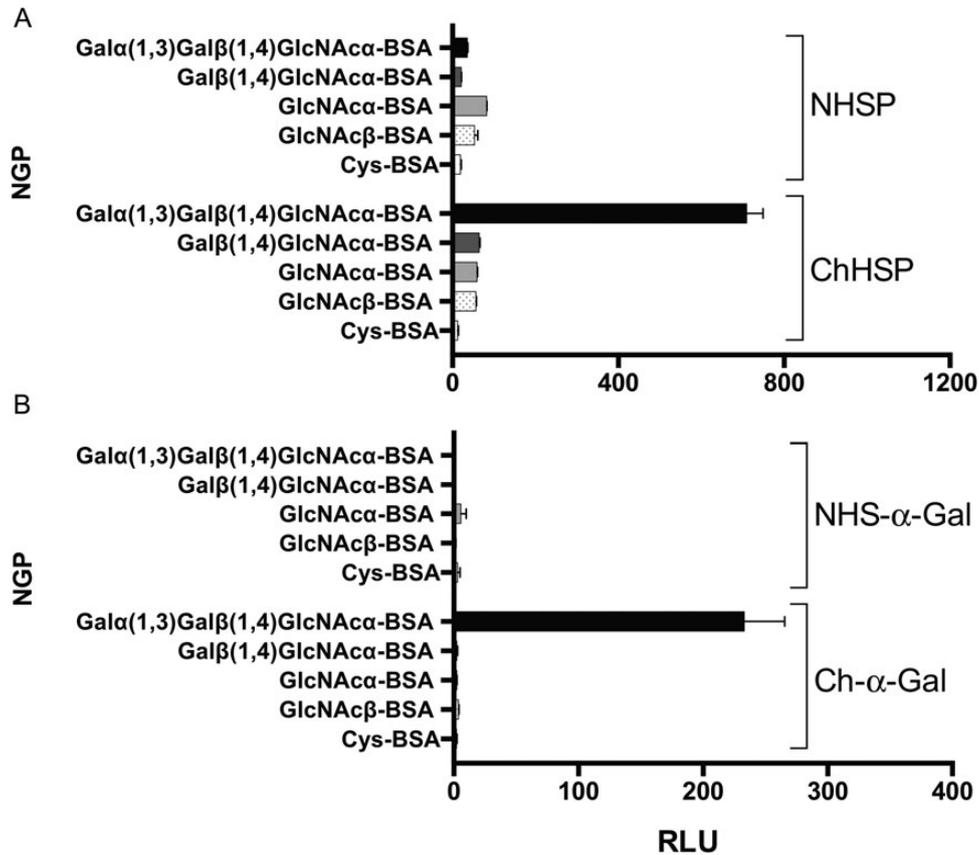


Fig. 3. (A) CL-ELISA reactivity of NHSP vs. ChHSP to NGP. (B) CL-ELISA reactivity of purified normal human sera anti- α -Gal Abs (NHS anti- α -Gal) vs. Chagasic anti- α -Gal Abs (Ch anti- α -Gal) to NGPs. RLU, relative luminescence units.

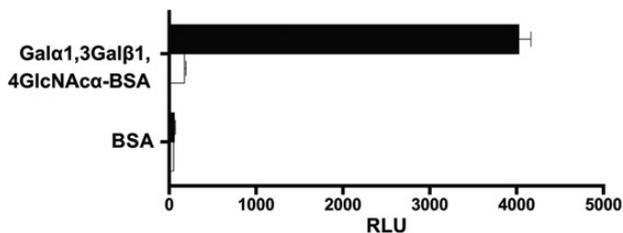


Fig. 4. CL-ELISA reactivity of α 1,3GalT-KO mouse serum to Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α -BSA and BSA before (unfilled bar) and after (filled bar) immunization with the NGP or control (BSA).

substitution and thiol-ene reaction. Finally, we showed that the trisaccharide Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α , which is an immunodominant glycotope in infective *T. cruzi* trypomastigotes, is highly immunogenic in the context of *T. cruzi* infection in both mice and humans. We propose that the Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α -BSA and its analogs containing different carrier proteins or peptides could be further explored as potential biomarkers or tools for the diagnosis and follow-up of chemotherapy of ChD, and as vaccine candidates.

Materials and methods

Thin-layer chromatography was performed with silica gel on aluminum support, 8.0–12.0 μ m, Sigma-Aldrich, and visualized by UV light or with 2% H₂SO₄ in ethanol, followed by heating. Flash

chromatography was performed with silica gel, grade A, 32–63 μ m, Dynamic Adsorbents. ¹H-nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a JEOL 600 MHz NMR spectrometer using tetramethylsilane or chloroform as an internal standard. ¹³C-NMR spectra were recorded on the same JEOL NMR spectrometer at 150 MHz. Optical rotations were recorded on an Atago AP300 automatic polarimeter. Mass spectra were recorded on a JEOL Accu TOF mass spectrometer using electrospray ionization, or on a Shimadzu Axima MALDI-TOF MS. Dichloromethane and pyridine were refluxed over calcium hydride and distilled, and methanol was refluxed over magnesium and distilled. Reagents were purchased from Sigma-Aldrich, Acros Organics, Fisher Scientific and Alfa Aesar. 96-well polystyrene Nunc MaxiSorp ELISA plates and CL-ELISA reagents were purchased from Thermo Scientific or Jackson ImmunoResearch, and luminescence was recorded on a Luminoskan Ascent, Thermo Scientific.

3-Thiopropyl- α -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-deoxy-2-acetamido- α -D-glucopyranoside (1)

To a flask containing 17 (0.027 g, 0.018 mmol), 3 mL of 0.5 M NaOMe was added under argon, and stirred at room temperature (RT) for 30 min. High resolution mass spectrometry (HRMS) showed full removal of acyl protecting groups, and all material was present as a mixture of thiol and disulfide. Amberlyst-15 ion-exchange resin was added and stirred until the solution was neutral, followed by filtration through Celite and evaporation of the solvent. The remainder was dissolved in water and lyophilized to give 1 as a white powder (0.011 g,

quant). ESI-TOF HRMS $[C_{23}H_{41}NO_{16}S + Na]^+$ calc. $m/z = 642.2044$, found 642.1980.

3-Thiopropyl β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-deoxy-2-acetamido- α -D-glucopyranoside (2)

To a flask containing 20 (0.045 g, 0.051 mmol), 4 mL of 0.5 M NaOMe was added under argon, and stirred at RT for 30 min. HRMS showed full removal of acyl protecting groups, and all the material was present as a disulfide. Amberlyst-15 ion-exchange resin was added and stirred until the solution was neutral, followed by filtration through Celite and evaporation of the solvent. The remainder was dissolved in water and lyophilized to give the disulfide form of 2 as a white powder (0.024 g, quant). ESI-TOF HRMS $[C_{34}H_{60}N_2O_{22}S_2 + Na]^+$ calc. $m/z = 935.2977$, found 935.2836.

3-Thiopropyl 2-deoxy-2-acetamido- β -D-glucopyranoside (4)

To a flask containing 22 (0.059 g, 0.127 mmol), 4 mL of 0.5 M NaOMe was added under argon, and stirred at RT for 2 h. HRMS showed full removal of acyl protecting groups, and most of the material was present as a disulfide. Amberlyst-15 ion-exchange resin was added and stirred until the solution was neutral, followed by filtration through Celite and evaporation of the solvent. The remainder was dissolved in water and lyophilized to give mostly the disulfide form of 4 as a white powder (0.037 g, quant.). ESI-TOF HRMS $[C_{22}H_{40}N_2O_{12}S_2 + Na]^+$ calc. $m/z = 611.1920$, found 611.1707.

Allyl 3-*O*-(4-methoxybenzyl)- β -D-galactopyranoside (6)

A solution of 5 (Stevenson and Furneaux 1996) (0.409 g, 1.86 mmol) and Bu_2SnO (0.693 g, 2.79 mmol) in 18 mL anhydrous MeOH was stirred and refluxed under argon for 8 h. The solution was then quickly concentrated, and resuspended in 18 mL benzene. Bu_4NBr (0.30 g, 0.93 mmol) was added, followed by 4-methoxybenzyl chloride (0.378 mL, 2.79 mmol), and stirred at 80°C for 12 h. The solution was concentrated, and purified by column chromatography on silica gel ($CHCl_3/MeOH$, 9:1) to give 6 as a white powder (0.430 g, 75%). Its 1H - and ^{13}C -NMR spectra matched the ones previously described for this compound (Yoshida et al. 2001).

Allyl 3-*O*-(4-methoxybenzyl)-2,4,6-tri-*O*-benzoyl- β -D-galactopyranoside (7)

A solution of 6 (0.380 g, 1.22 mmol) in 5 mL anhydrous pyridine was cooled to 0°C under argon. $BzCl$ (0.854 mL, 7.35 mmol) was added dropwise and stirred for 3 h. The solution was diluted with EtOAc, washed once with 1 M HCl, once with a sat. $NaHCO_3$ solution and once with brine, dried over $MgSO_4$, filtered, concentrated and purified by column chromatography on silica gel (hexanes/EtOAc 2:1) to give 7 as a white powder (0.658 g, 90%). $[\alpha]_D^{28} 72.4$ ($c = 1$ in $CHCl_3$); $R_f = 0.38$ (MeOH/ $CHCl_3$ 1:9); 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ 8.18; 8.05; 7.97; 7.56–7.61; 7.43–7.50 (5m, 15H, 3 \times Bz); 7.05; 6.59 (2m, 4H, 4-OMe-benzyl); 5.90 (m, 1H, H-4); 5.77 (m, 1H, OCH_2CHCH_2); 5.55 (dd, 1H, $^3J_{H1/H2} = 8.9$ Hz, $^3J_{H2/H3} = 8.9$ Hz, H-2); 5.18 (m, 1H, OCH_2CHCH_2); 5.07 (m, 1H, OCH_2CHCH_2); 4.60–4.67 (m, 3H, H-1, H-6, CH_2PhOMe); 4.41–4.47 (m, 2H, H-6', CH_2PhOMe); 4.35 (m, 1H, OCH_2CHCH_2); 4.13 (m, 1H, OCH_2CHCH_2); 4.08 (m, 1H, H-5); 3.79 (dd, 1H, $^3J_{H3/H4} = 3.4$ Hz, H-3); 3.70 (s, 3H, OCH_3) ppm. ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ 166.3; 166.0; 165.3; 159.3; 133.7; 133.5; 133.4; 133.1; 130.3; 129.6–130.1; 129.5; 129.4; 128.5–128.7; 128.4; 117.7; 113.7; 100.2 (C-1); 75.8; 71.5; 71.3; 70.7; 70.1; 66.8; 62.8;

55.2 ppm. ESI-TOF HRMS $[C_{38}H_{36}O_{10} + Na]^+$ calc. $m/z = 675.2206$, found 675.2001; $[C_{38}H_{36}O_{10} + K]^+$ calc. $m/z = 691.1946$, found 691.2022.

Allyl 2,4,6-tri-*O*-benzoyl- β -D-galactopyranoside (8)

To a solution of 7 (0.633 g, 0.97 mmol) in 20 mL CH_2Cl_2 and 1.1 mL H_2O , DDQ (0.440 g, 1.94 mmol) was added in two portions, 30 min apart, and stirred vigorously for 12 h. The red and green solution was filtered through Celite, diluted with dichloromethane, and extracted with water (25 mL) and brine solution (25 mL), dried over $MgSO_4$, filtered, concentrated and purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/hexanes 2:1) to give 8 as a white powder (0.504 g, 98%). Its 1H - and ^{13}C -NMR spectra matched the ones previously described for this compound (Sherman et al. 2001).

Allyl 4,6-di-*O*-*tert*-butylsilylene-2,3-di-*O*-benzoyl- α -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-*O*-benzoyl- β -D-galactopyranoside (10)

A solution of acceptor 8 (0.175 g, 0.329 mmol) and 4,6-di-*O*-*tert*-butylsilyl-2,3-di-*O*-benzoyl- α -D-galactopyranosyl trichloroacetimidate donor 9 (Imamura et al. 2006) (0.266 g, 0.395 mmol) in anhydrous dichloromethane (6 mL) was added to a 10-mL round-bottomed flask with freshly activated, crushed 4 Å molecular sieves and stirred under argon for 15 min at 0°C. TMS-OTf (0.010 mL, 0.059 mmol) was added dropwise, and the mixture was gradually brought to RT and stirred for 2 h. To quench the reaction, Et_3N (0.010 mL, 0.072 mmol) was added and stirred. The solution was diluted with dichloromethane (50 mL) and extracted with water (2 \times 25 mL) and brine solution (25 mL), dried over $MgSO_4$, filtered, concentrated and purified by column chromatography on silica gel (hexanes/EtOAc 3:1) to give 10 as a white powder (0.315 g, 92%). $[\alpha]_D^{28} 160.7$ ($c = 1$ in $CHCl_3$); $R_f = 0.55$ (EtOAc/hexanes 1:2); 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ 8.09, 7.99, 7.84, 7.74, 7.60, 7.51, 7.41, 7.26, 7.13, 7.01 (10m, 25H, 5 \times Bz); 5.79–5.87 (m, 2H, OCH_2CHCH_2 , $\beta GalH$ -4); 5.70–5.76 (m, 2H, $\alpha GalH$ -2, $\beta GalH$ -2); 5.62 (d, 1H, $^3J_{H1/H2} = 3.4$ Hz, $\alpha GalH$ -3); 5.26 (m, 1H, OCH_2CHCH_2); 5.16 (m, 2H, OCH_2CHCH_2 , $\alpha GalH$ -3); 4.77 (d, 1H, $^3J_{H1/H2} = 8.3$ Hz, $\beta GalH$ -1); 4.55 (dd, 1H, $^3J_{H5/H6} = 11.7$ Hz, $^2J_{H6/H6'} = 6.9$ Hz, $\beta GalH$ -6); 4.40 (m, 1H, OCH_2CHCH_2); 4.22–4.30 (m, 3H, $\beta GalH$ -3, $\beta GalH$ -5, $\alpha GalH$ -4); 4.19 (m, 1H, OCH_2CHCH_2); 4.03–4.14 (m, 2H, $\alpha GalH$ -5, $\beta GalH$ -6'); 3.64–3.71 (m, 2H, $\alpha GalH$ -6, $\alpha GalH$ -6'); 1.02 (s, 9H, *t*-butyl); 0.79 (s, 9H, *t*-butyl) ppm. ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ 166.3, 166.1, 165.6, 165.4, 165.0, 133.6, 133.4; 133.4; 133.0; 132.9; 132.8; 129.5–129.9; 129.2; 128.8; 128.6; 128.3; 128.1; 118.0; 100.3 (βC -1); 94.2 (αC -1); 73.8; 71.5; 70.9; 70.7; 70.5; 70.2; 67.6; 67.1; 66.5; 65.9; 62.3; 27.4; 27.2; 25.4; 23.2; 20.7 ppm. ESI-TOF HRMS $[C_{58}H_{62}O_{16}Si + Na]^+$ calc. $m/z = 1065.3705$, found 1065.3587; $[C_{58}H_{62}O_{16}Si + K]^+$ calc. $m/z = 1081.3444$, found 1081.2728.

Allyl 2,3-di-*O*-benzoyl-4,6-di-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-*O*-benzoyl- β -D-galactopyranoside (11)

A solution of 10 (0.464 g, 0.444 mmol) in anhydrous THF (7 mL) was added to a 50 mL plastic conical tube and stirred under argon at RT. A solution of HF-pyridine (70% HF, 30% pyridine) (0.223 mL, 8.88 mmol) was added to the reaction mixture and stirred for 3 h, then quenched with 0.5 mL saturated $NaHCO_3$. The solution was diluted with EtOAc and extracted with water and brine, dried

over MgSO₄, and concentrated. The compound was then added to a 25 mL round bottom flask in 5 mL anhydrous pyridine, and Ac₂O was added (0.252 mL, 2.66 mmol) and stirred for 12 h. The solvent was then co-evaporated with toluene, and the remainder was purified by column chromatography on silica gel (hexanes/EtOAc 2:1) to give **11** as a white powder (0.389 g, 89% in 2 steps). $[\alpha]_{\text{D}}^{28}$ 163.0 (*c* = 1 in CHCl₃); *R*_f = 0.20 (EtOAc/hexanes 1:2); ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, 300 K): δ 8.15; 7.99; 7.70; 7.61; 7.51; 7.44; 7.39; 7.28; 7.24; 7.10; 7.01 (11m, 25H, 5 × Bz); 5.80–5.86 (m, 2H, OCH₂-CHCH₂, βGalH-4); 5.76 (dd, 1H, ³J_{H2/H3} = 9.6 Hz, βGalH-2); 5.67 (d, 1H, ³J_{H1/H2} = 4.1 Hz, αGalH-1); 5.61 (dd, 1H, ³J_{H2/H3} = 11.0 Hz, αGalH-2); 5.41 (dd, 1H, ³J_{H3/H4} = 3.4 Hz, αGalH-3); 5.26 (m, 1H, OCH₂CHCH₂); 5.09–5.17 (m, 2H, OCH₂CHCH₂, αGalH-4); 4.78 (d, 1H, ³J_{H1/H2} = 7.6 Hz, βGalH-1); 4.57 (dd, 1H, ³J_{H5/H6} = 11.0 Hz, ²J_{H6/H6'} = 6.2 Hz, βGalH-6); 4.41 (m, 1H, OCH₂CHCH₂); 4.27–4.32 (m, 2H, βGalH-3, βGalH-5); 4.19 (m, 2H, OCH₂CHCH₂, αGalH-5); 4.11 (dd, 1H, ³J_{H5/H6} = 6.6 Hz, βGalH-6'); 3.96 (m, 2H, αGalH-6, αGalH-6'); 1.97–2.03 (m, 6H, 2 × Ac) ppm. ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, 300 K): δ 170.1; 169.8; 166.2; 166.0; 165.4; 165.1; 164.9; 133.6; 133.5; 133.4; 133.1; 133.0; 129.8; 129.8; 129.7; 129.5; 129.5; 129.3; 128.8; 128.6; 128.4; 128.3; 128.3; 128.2; 118.1; 100.3 (βC-1); 93.4 (αC-1); 73.4; 71.5; 70.6; 70.2; 67.9; 67.6; 66.8; 65.5; 62.3; 61.5; 20.8; 20.6 ppm. ESI-TOF HRMS [C₅₄H₅₀O₁₈ + NH₄]⁺ calc. *m/z* = 1004.3341, found 1004.3070.

Trichloroacetimidate 2,3-di-*O*-benzoyl-4,6-di-*O*-acetyl-α-D-galactopyranosyl-(1 → 3)-2,4,6-tri-*O*-benzoyl-β-D-galactopyranoside (**12**)

To a solution of **11** (0.369 g, 0.374 mmol) in MeOH (6 mL), PdCl₂ (0.0398 g, 0.225 mmol) was added and stirred for 2 h at RT until consumption of most of the starting material. After 2 h, a degradation product can be observed. The solution was filtered through Celite, concentrated and purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/hexanes 2:3) to give the α and β anomers (0.308 g, 87%). A recovered compound assumed to be remaining starting material was actually the vinyl glycoside. The anomeric product mixture was then placed into a round-bottomed flask, 10 mL anhydrous CH₂Cl₂ was added under argon, and the solution was cooled to 0°C. CCl₃CN (0.325 mL, 3.24 mmol) was added, followed by dropwise addition of DBU (0.015 mL, 0.097 mmol) and the mixture was brought to RT over 3 h. The solution was concentrated and purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/hexanes 1:2) to give **12** as a white powder (0.295 g, 84%). $[\alpha]_{\text{D}}^{27}$ 186.2 (*c* = 1 in CHCl₃); *R*_f = 0.65 (acetone/hexanes 1:1); ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, 300 K): δ 8.64 (s, 1H, NH); 8.10; 7.94; 7.67–7.71; 7.53–7.63; 7.47; 7.36–7.41; 7.23–7.30; 7.12; 7.02 (9m, 25H, 5 × Bz); 6.90 (d, 1H, ³J_{H1/H2} = 3.4 Hz, αGalH-1); 5.99 (d, 1H, ³J_{H4/H5} = 2.8 Hz, αGalH-4); 5.94 (dd, 1H, ³J_{H2/H3} = 10.3 Hz, αGalH-2); 5.76 (d, 1H, ³J_{H1/H2} = 3.4 Hz, αGal'H-1); 5.65 (dd, 1H, ³J_{H2/H3} = 10.3 Hz, αGal'H-2); 5.49 (dd, 1H, ³J_{H3/H4} = 3.4 Hz, αGal'H-3); 5.28 (m, 1H, αGal'H-4); 4.76 (dd, 1H, ³J_{H3/H4} = 3.4 Hz, αGalH-3); 4.65 (m, 1H, αGalH-5); 4.44 (dd, 1H, 7.6 Hz, 11.7 Hz, αGalH-6); 4.41 (dd, 1H, ³J_{H5/H6} = 11.7 Hz, αGal'H-5); 4.31 (dd, 1H, 5.5 Hz, 11.7 Hz, αGalH-6'); 4.09–4.14 (m, 1H, αGal'H-6); 4.02 (dd, 1H, ²J_{H6/H6'} = 6.2 Hz, αGal'H-6'); 1.98–2.06 (m, 6H, 2 × Ac) ppm. ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, 300 K): δ 170.2; 169.8; 166.0; 165.6; 165.3; 165.0; 160.5; 133.9; 133.0–133.3; 129.6–129.9; 129.4; 128.8; 128.5; 128.3; 128.2; 93.8 (αGalC-1); 93.2 (αGal'C-1); 90.9 (CCl₃); 70.1; 69.5; 68.7; 67.8; 66.7; 66.0; 62.5; 60.9; 20.9; 20.6 ppm. ESI-TOF HRMS did not show a molecular ion peak for [C₅₃H₄₆Cl₃NO₁₈]⁺.

Allyl 2-deoxy-2-acetamido-3,6-di-*O*-benzoyl-α-D-glucopyranoside (**13**)

To a solution of allyl 2-deoxy-2-acetamido-α-D-glucopyranoside (Gavard et al. 2003) (3.98 g, 15.24 mmol) in 80 mL anhydrous AcCN, 1-benzoylimidazole (5.46 mL, 36.56 mmol) was added via a plastic syringe and was heated at 80°C for 12 h. After evaporation of the solvent, the remainder was dissolved in EtOAc and extracted twice with water and once with brine solution, dried over MgSO₄, filtered, concentrated and purified by column chromatography on silica gel (toluene/EtOAc 2:1) to give **13** as a white powder (4.79 g, 67%). Its ¹H- and ¹³C-NMR spectra matched the ones previously described for this compound (Danac et al. 2007). A minor by-product with a higher *R*_f value was identified as the tri-*O*-benzoylated compound.

Allyl 2-deoxy-2-azido-3,6-di-*O*-benzoyl-α-D-glucopyranoside (**14**)

Compound **14** was prepared similarly to a published synthesis with slight variations in the solvent and the time period over which BzCl was added (Danac et al. 2007): a solution of allyl 2-deoxy-2-azido-α-D-glucopyranoside (Gavard et al. 2003) (0.30 g, 1.223 mmol) in 10 mL anhydrous pyridine was cooled to –20°C, and BzCl (0.350 mL, 3.01 mmol) was added dropwise in three portions of 0.117 mL each over 1 h, and stirred for an additional 1 h. The solution was diluted with EtOAc and extracted twice with water and once with brine solution, dried over MgSO₄, filtered, concentrated and purified by column chromatography on silica gel (hexanes/EtOAc 5:2) to give **14** as a white powder (0.364 g, 66%). $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ 161.0 (*c* = 1 in CHCl₃); *R*_f = 0.48 (EtOAc/hexanes 1:2); ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, 300 K): δ 8.05–8.11; 7.58; 7.43–7.48 (m, 10H, 2 × Bz); 5.95 (m, 1H, OCH₂CHCH₂); 5.64 (dd, 1H, ³J_{H3/H4} = 9.6 Hz, H-3); 5.36 (m, 1H, OCH₂CHCH₂); 5.25 (m, 1H, OCH₂CHCH₂); 5.09 (d, 1H, ³J_{H1/H2} = 4.1 Hz, H-1); 4.73 (dd, 1H, ³J_{H5/H6} = 4.8 Hz, ²J_{H6/H6'} = 12.4 Hz, H-6); 4.60 (dd, 1H, ³J_{H5/H6} = 2.1 Hz, H-6'); 4.29 (m, 1H, CH₂CHCH₂); 4.12 (m, 2H, H-5, CH₂CHCH₂); 3.77 (dd, 1H, ³J_{H4/H5} = 9.6 Hz, H-4); 3.47–3.54 (broad, 1H, 4-OH); 3.44 (dd, 1H, ³J_{H2/H3} = 11.0 Hz, H-2) ppm. ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, 300 K): δ 167.2; 167.0; 133.7; 133.4; 133.0; 130.1; 129.7–130.0; 129.2; 128.6; 128.6; 118.5; 97.0 (C-1); 74.0; 70.7; 70.0; 69.0; 63.5; 61.2 ppm. ESI-TOF HRMS [C₂₃H₂₃N₃O₇ + H]⁺ calc. *m/z* = 454.1614, found 454.1912. A minor by-product of this reaction was identified as the tri-*O*-benzoylated compound.

Allyl 2,3-di-*O*-benzoyl-4,6-di-*O*-acetyl-α-D-galactopyranosyl-(1 → 3)-2,4,6-tri-*O*-benzoyl-β-D-galactopyranosyl-(1 → 4)-2-deoxy-2-azido-3,6-di-*O*-benzoyl-α-D-glucopyranoside (**15**)

A solution of acceptor **14** (0.126 g, 0.279 mmol) and donor **12** (0.304 g, 0.279 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (6 mL) was placed in a 10-mL round-bottomed flask with freshly activated, crushed 4 Å molecular sieves and stirred under argon for 15 min at 0°C. TMS-OTf (0.015 mL, 0.0835 mmol) was added dropwise to the reaction mixture, which was gradually brought to RT and stirred for 2 h. The reaction was quenched with Et₃N (0.02 mL, 0.143 mmol), filtered through Celite, concentrated and purified by column chromatography on silica gel (hexanes/EtOAc 2:1) to give **15** as a slightly yellow powder (0.175 g, 46%). $[\alpha]_{\text{D}}^{26}$ 106.1 (*c* = 1 in CHCl₃); *R*_f = 0.53 (EtOAc/hexanes 1:1); ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, 300 K): δ 8.20; 8.02; 7.97; 7.68; 7.55–7.64; 7.36–7.52; 7.31; 7.23; 7.11; 6.97 (10 m, 35H, 7 × Bz); 5.93 (m, 1H, OCH₂CHCH₂); 5.87 (dd, 1H, ³J_{H2/H3} = 9.5 Hz,

$^3J_{H3/H4} = 9.5$ Hz, α GlcH-3); 5.66 (dd, 1H, $^3J_{H1/H2} = 9.5$ Hz, β GalH-2); 5.56 (m, 1H, β GalH-4); 5.53 (d, 1H, $^3J_{H1/H2} = 3.4$ Hz, α GalH-1); 5.34 (m, 1H, OCH_2CHCH_2); 5.30 (dd, 1H, $^3J_{H2/H3} = 10.3$ Hz, α GalH-2); 5.24 (m, 1H, $OCH_2'CHCH_2$); 5.06 (d, 1H, $^3J_{H1/H2} = 3.4$ Hz, α GlcH-1); 4.95 (m, 1H, α GalH-3); 4.80 (d, 1H, $^3J_{H1/H2} = 7.9$ Hz, β GalH-1); 4.53–4.60 (m, 2H, β GalH-6, β GalH-6'); 4.26 (m, 1H, OCH_2CHCH_2); 4.05–4.18 (m, 5H, OCH_2CHCH_2 , β GalH-3, β GalH-5, α GlcH-4, α GalH-4); 4.01 (m, 1H, α GalH-5); 3.87 (dd, 1H, $^3J_{H5/H6} = 11.0$ Hz, $^2J_{H6/H6'} = 6.9$ Hz, α GalH-6); 3.82 (dd, 1H, $^3J_{H5/H6} = 11.7$ Hz, α GalH-6'); 3.73–3.78 (m, 2H, α GlcH-5, α GlcH-6); 3.40–3.49 (m, 2H, α GlcH-2, α GlcH-6'); 1.95–1.99 (m, 6H, 2 \times Ac) ppm. ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ 170.3; 169.7; 166.0; 165.9; 165.7; 165.2; 164.8; 164.5; 133.8; 133.5; 133.2; 133.0–133.1; 132.9; 129.2–130.0; 128.5–128.9; 128.0–128.4; 118.7; 101.3 (β GalC-1); 96.9 (α GlcC-1); 92.9 (α GalC-1); 76.4; 73.2; 71.3; 70.8; 70.6; 69.1; 69.0; 67.9; 67.8; 67.3; 66.8; 64.6; 62.5; 61.8; 61.4; 61.1; 20.7; 20.5 ppm. ESI-TOF HRMS [$C_{74}H_{67}N_3O_{24} + Na$] $^+$ calc. $m/z = 1399.4458$, found 1399.4391; [$C_{74}H_{67}N_3O_{24} + K$] $^+$ calc. $m/z = 1420.3752$, found 1420.3016.

Allyl 2,3-di-*O*-benzoyl-4,6-di-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-*O*-benzoyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-deoxy-2-acetamido-3,6-di-*O*-benzoyl- α -D-glucopyranoside (16)

To a flask containing 15 (0.125 g, 0.0904 mmol), was added 8 mL of AcSH, and was stirred for 24 h at 40°C. The solution was concentrated by two co-evaporations with toluene and purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/hexanes 1:1 \rightarrow 3:1) to give 16 as a white powder (0.097 g, 77%). $[\alpha]_D^{26} 94.3$ ($c = 1$ in $CHCl_3$); $R_f = 0.15$ (hexanes/EtOAc 1:1); 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ 8.20; 8.02; 7.96; 7.68; 7.55–7.63; 7.47–7.53; 7.36–7.45; 7.28–7.35; 7.22; 7.15; 7.03; 6.95 (10m, 35H, 7 \times Bz); 5.84–5.92 (m, 2H, OCH_2CHCH_2 , NH); 5.52–5.67 (m, 5H, β GalH-2, β GalH-4, α GalH-1, α GlcNAcH-3); 5.26–5.31 (m, 2H, α GalH-2, OCH_2CHCH_2); 5.23 (m, 1H, OCH_2CHCH_2); 4.90–4.94 (m, 2H, α GlcNAcH-1, α GalH-3); 4.80 (d, 1H, $^3J_{H1/H2} = 7.6$ Hz, β GalH-1); 4.50–4.59 (m, 3H, α GlcNAcH-2); 4.06–4.22 (m, 4H, β GalH-3, OCH_2CHCH_2); 4.00 (m, 2H, OCH_2CHCH_2); 3.88 (dd, 1H); 3.78–3.84 (m, 2H); 3.66–3.72 (m, 2H); 1.96–2.00 (m, 6H, 2 \times Ac); 1.86 (s, 3H, NHAc) ppm. ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ 170.3; 170.2; 169.7; 166.6; 166.1; 165.9; 165.7; 165.2; 164.8; 164.6; 133.9; 133.5; 133.3; 133.1; 133.1; 132.9; 130.0; 129.5–129.8; 129.4; 129.2; 128.9; 128.6–128.8; 128.0–128.4; 118.6; 101.3 (β GalC-1); 96.4 (α GlcNAcC-1); 92.9 (α GalC-1); 75.9; 73.2; 71.7; 71.4; 70.8; 69.0; 68.8; 67.9; 67.8; 67.3; 66.8; 64.6; 62.5; 61.8; 61.1; 52.1; 29.8; 23.3; 20.8; 20.5 ppm. ESI-TOF HRMS [$C_{76}H_{71}NO_{25} + H$] $^+$ calc. $m/z = 1398.4393$, found 1398.4308; [$C_{76}H_{71}NO_{25} + Na$] $^+$ calc. $m/z = 1420.4213$, found 1420.4487; [$C_{76}H_{71}NO_{25} + K$] $^+$ calc. $m/z = 1436.3935$, found 1436.3893.

3-(Acetylthio)propyl 2,3-di-*O*-benzoyl-4,6-di-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-*O*-benzoyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-deoxy-2-acetamido-3,6-di-*O*-benzoyl- α -D-glucopyranoside (17)

To a solution of 16 (0.030 g, 0.022 mmol) and AIBN (0.004 g, 0.022 mmol) in anhydrous THF (3 mL), AcSH (0.016 mL, 0.222 mmol) was added and stirred under argon for 5 min. The solution was then placed in a Rayonet UV reactor (350 nm) and stirred for 12 h under water cooling (\sim RT). The solution was concentrated by

two co-evaporations with toluene and purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/Hex 2:1) to give 17 as a white powder (0.028 g, 89%). $[\alpha]_D^{26} 94.2$ ($c = 0.5$ in $CHCl_3$); $R_f = 0.48$ (EtOAc/hexanes 2:1); 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ 8.20; 8.01; 7.96; 7.68; 7.55–7.63; 7.47–7.53; 7.20–7.45; 7.13; 7.06; 6.95 (10m, 35H, 7 \times Bz); 6.19 (d, 1H, $^3J_{NH/H2} = 9.3$ Hz, NH); 5.52–5.67 (m, 4H, β GalH-2, α GalH-2); 5.52 (d, 1H, $^3J_{H1/H2} = 3.4$ Hz, α GalH-1); 5.28 (dd, 1H, $^3J_{H2/H3} = 10.3$ Hz, $^3J_{H3/H4} = 10.3$ Hz, α GalH-3); 4.92 (m, 1H, α GalH-4); 4.83 (d, 1H, $^3J_{H1/H2} = 3.4$ Hz, α GlcNAcH-1); 4.79 (d, 1H, $^3J_{H1/H2} = 8.3$ Hz, β GalH-1); 4.52–4.59 (m, 3H, α GlcNAcH-2); 4.09–4.16 (m, 2H); 4.04 (m, 1H); 4.00 (m, 1H, α GalH-5); 3.87 (dd, 1H, $^3J_{H5/H6} = 11.7$ Hz, $^2J_{H6/H6'} = 6.9$ Hz, α GalH-6); 3.81 (dd, 1H, $^3J_{H5/H6} = 11.7$ Hz, α GalH-6'); 3.68–3.78 (m, 3H, $OCH_2CH_2CH_2$); 3.62 (dd, 1H); 3.44 (m, 1H, $OCH_2CH_2CH_2$); 3.09 (m, 1H, $OCH_2CH_2CH_2$); 2.95 (m, 1H, $OCH_2CH_2CH_2$); 2.32 (s, 3H, SAc); 1.97–1.99 (m, 6H, 2 \times Ac); 1.85–1.92 (m, 5H, NHAc, OCH_2CH_2 , OCH_2CH_2') ppm. ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ 195.8; 170.5; 170.3; 169.7; 166.5; 165.9; 165.7; 165.1; 164.6; 133.9; 133.5; 133.2; 133.1; 133.1; 133.0; 132.8; 129.3–130.0; 128.6–129.2; 128.0–128.4; 101.3 (β GalC-1); 97.4 (α GlcNAcC-1); 92.9 (α GalC-1); 76.1; 73.2; 71.8; 71.4; 70.8; 69.1; 67.9; 67.8; 67.3; 66.8; 66.0; 64.6; 62.5; 61.8; 61.1; 51.9; 30.7; 29.8; 29.3; 25.5; 23.2; 20.8; 20.5 ppm. ESI-TOF HRMS [$C_{78}H_{75}NO_{26}S + H$] $^+$ calc. $m/z = 1474.4376$, found 1474.4222.

Allyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-deoxy-2-acetamido-3,6-di-*O*-benzoyl- α -D-glucopyranoside (19)

To a solution of acceptor 13 (Danac et al. 2007) (3.60 g, 7.63 mmol) and donor 18 (Schmidt and Michel 1980) (14.0 g, 28.42 mmol) in 60 mL anhydrous CH_2Cl_2 , $BF_3 \cdot OEt_2$ (1.93 mL, 15.25 mmol) was added and immediately brought to 35–40°C. After 3 h, Et_3N (2.35 mL, 16.87 mmol) was added. The solution was washed one time with a saturated $NaHCO_3$ solution, and the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 . The organic phases were combined, dried over $MgSO_4$, filtered, concentrated and purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/Hex 2.3:1) to give 19 as a white powder (5.10 g, 83%). $[\alpha]_D^{22} 56.6$ ($c = 1$ in $CHCl_3$); $R_f = 0.30$ (EtOAc/hexanes 2:1); 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ 8.07; 7.61; 7.52; 7.47 (4 m, 10H, 2 \times Bz); 5.91 (m, 1H, OCH_2CHCH_2); 5.85 (d, 1H, $^3J_{NH/H2} = 9.6$ Hz, NH); 5.62 (dd, 1H, $^3J_{H2/H3} = 11.0$ Hz, $^3J_{H3/H4} = 8.3$ Hz, α GlcNAcH-3); 5.30 (m, 1H, OCH_2CHCH_2); 5.25 (m, 1H, $OCH_2'CHCH_2$); 5.13 (m, 1H, β GalH-4); 5.10 (dd, 1H, $^3J_{H2/H3} = 10.3$ Hz, β GalH-2); 4.91 (d, 1H, $^3J_{H1/H2} = 3.4$ Hz, α GlcNAcH-1); 4.82 (dd, 1H, $^3J_{H3/H4} = 3.4$ Hz, β GalH-3); 4.69 (m, 1H, α GlcNAcH-6); 4.61 (d, 1H, $^3J_{H1/H2} = 8.3$ Hz, β GalH-1); 4.47 (m, 1H, α GlcNAcH-2); 4.41 (dd, 1H, $^2J_{H6/H6'} = 4.1$ Hz, $^3J_{H5/H6} = 11.7$ Hz, α GlcNAcH-6'); 4.22 (m, 1H, OCH_2CHCH_2); 4.07–4.15 (m, 2H, α GlcNAcH-4, α GlcNAcH-5); 4.03 (m, 1H, OCH_2CHCH_2'); 3.64 (dd, 1H, $^3J_{H5/H6} = 8.3$ Hz, $^2J_{H6/H6'} = 11.0$ Hz, β GalH-6); 3.48 (dd, 1H, $^3J_{H5/H6} = 5.5$ Hz, β GalH-6'); 3.36 (dd, 1H, 6.2 Hz, 8.3 Hz, β GalH-5); 1.80–2.10 (m, 15H, 4 \times Ac, NHAc) ppm. ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ 170.2; 169.9; 169.4; 166.4; 166.1; 133.6; 133.5; 133.2; 129.8; 129.7; 128.7; 128.6; 118.6; 101.1 (β GalC-1); 96.5 (α GlcNAcC-1); 76.4; 72.2; 71.0; 70.6; 69.4; 68.9; 68.8; 66.3; 62.6; 60.0; 52.2; 23.2; 20.5–20.8 ppm. ESI-TOF HRMS [$C_{39}H_{45}NO_{17} + H$] $^+$ calc. $m/z = 800.2766$, found 800.2864; [$C_{39}H_{45}NO_{17} + Na$] $^+$ calc. $m/z = 822.2585$, found 822.2022; [$C_{39}H_{45}NO_{17} + K$] $^+$ calc. $m/z = 838.2325$, found 838.1110.

3-(Acetylthio)propyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-deoxy-2-acetamido-3,6-di-*O*-benzoyl- α -D-glucopyranoside (20)

To a solution of **19** (0.050 g, 0.063 mmol) and AIBN (0.010 g, 0.063 mmol) in anhydrous THF (3 mL), AcSH (0.045 mL, 0.63 mmol) was added and stirred under argon for 5 min. The solution was then placed in a Rayonet UV reactor (350 nm) stirred for 12 h under water cooling (\sim RT). The solution was concentrated by two co-evaporations with toluene, and purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/Hex 2:1) to give **20** as a white powder (0.046 g, 84%). $[\alpha]_D^{22}$ 45.6 (c = 0.9 in CHCl₃); R_f = 0.25 (EtOAc/hexanes 2:1); ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, 300 K): δ 8.08; 7.61; 7.52; 7.47 (4 m, 10H, 2 \times Bz); 6.15 (d, 1H, ³ $J_{NH/H2}$ = 9.6 Hz, NH); 5.58 (dd, 1H, ³ $J_{H2/H3}$ = 10.3 Hz, ³ $J_{H3/H4}$ = 8.3 Hz, α GlcNAcH-3); 5.13 (m, 1H, β GalH-4); 5.10 (dd, 1H, ³ $J_{H2/H3}$ = 10.3 Hz, β GalH-2); 4.80–4.84 (m, 2H, α GlcNAcH-1, β GalH-3); 4.70 (m, 1H, α GlcNAcH-6); 4.60 (d, 1H, ³ $J_{H1/H2}$ = 8.3 Hz, β GalH-1); 4.48 (m, 1H, α GlcNAcH-2); 4.40 (dd, 1H, ² $J_{H6/H6'}$ = 4.1 Hz, ³ $J_{H5/H6'}$ = 11.7 Hz, α GlcNAcH-6'); 4.09 (m, 2H, α GlcNAcH-4, α GlcNAcH-5); 3.80 (m, 1H, OCH₂CH₂CH₂); 3.61 (dd, 1H, ³ $J_{H5/H6}$ = 8.3 Hz, ² $J_{H6/H6'}$ = 11.0 Hz, β GalH-6); 3.47 (m, 2H, OCH₂'CH₂CH₂, β GalH-6'); 3.37 (m, 1H, β GalH-5); 3.10 (m, 1H, OCH₂CH₂CH₂); 2.96 (m, 1H, OCH₂CH₂CH₂); 2.35 (s, 3H, SAc); 1.85–2.05 (m, 17H, NHAc, 4 \times Ac, OCH₂CH₂CH₂) ppm. ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, 300 K): δ 195.7; 170.5; 170.1; 169.9; 169.4; 166.3; 166.1; 133.5; 129.8; 129.7; 128.7; 128.6; 101.1 (β GalC-1); 97.4 (α GlcNAcC-1); 76.4; 72.2; 71.0; 70.6; 69.4; 68.9; 66.3; 66.1; 62.6; 60.0; 52.1; 30.7; 29.8; 29.3; 25.6; 23.1; 20.5–20.8 ppm. ESI-TOF HRMS [C₄₁H₄₉NO₁₈S + H]⁺ calc. m/z = 876.2749, found 876.3192; [C₄₁H₄₉NO₁₈S + Na]⁺ calc. m/z = 898.2568, found 898.2413.

3-(Acetylthio)propyl 2-deoxy-2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl- β -D-glucopyranoside (22)

To a solution of **21** (Kiso and Anderson 1979) (0.081 g, 0.209 mmol) and AIBN (0.034 g, 0.209 mmol) in anhydrous THF (5 mL), AcSH (0.149 mL, 2.09 mmol) was added and stirred under argon for 5 min. The solution was then placed in a Rayonet UV reactor (350 nm) and stirred for 12 h under water cooling (\sim RT). The solution was concentrated by two co-evaporations with toluene and purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH, 25:1) to give **22** as a white powder (0.082 g, 85%). $[\alpha]_D^{26}$ 11.9 (c = 1 in CHCl₃); R_f = 0.30 (MeOH/CHCl₃ 1:9) ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, 300 K): δ 6.20 (d, 1H, ³ $J_{NH/H2}$ = 8.9 Hz, NH); 5.17 (dd, 1H, ³ $J_{H2/H3}$ = 8.9 Hz, ³ $J_{H3/H4}$ = 10.3 Hz, H-3); 5.02 (dd, 1H, ³ $J_{H4/H5}$ = 9.62 Hz, H-4); 4.50 (d, 1H, ³ $J_{H1/H2}$ = 8.3 Hz, H-1); 4.20 (dd, 1H, ³ $J_{H5/H6}$ = 12.4 Hz, ² $J_{H6/H6'}$ = 4.8 Hz, H-6); 4.06 (dd, 1H, ³ $J_{H5/H6'}$ = 12.4 Hz, H-6'); 3.92 (m, 1H, H-2); 3.85 (m, 1H, OCH₂CH₂CH₂); 3.64 (m, 1H, H-5); 3.42 (m, 1H, OCH₂'CH₂CH₂); 3.00 (m, 1H, OCH₂CH₂CH₂); 2.75 (m, 1H, OCH₂CH₂CH₂); 2.28 (s, 3H, SAc); 1.80–2.10 (m, 13H, NHAc, 3 \times Ac, OCH₂CH₂CH₂); 1.69 (m, 1H, OCH₂CH₂'CH₂) ppm. ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, 300 K): δ 196.7; 171.0; 170.8; 170.6; 169.5; 100.8 (C-1); 72.9; 71.8; 68.7; 67.5; 62.2; 54.4; 30.7; 29.4; 25.4; 23.3; 20.6–20.9 ppm. ESI-TOF HRMS [C₁₉H₂₉NO₁₀S + H]⁺ calc. m/z = 464.1590, found 464.1340; [C₁₉H₂₉NO₁₀S + Na]⁺ calc. m/z = 486.1410, found 486.1100; [C₁₉H₂₉NO₁₀S + K]⁺ calc. m/z = 502.1149, found 502.0768.

Immunization protocol

Groups of five female C57Bl/6 α 1,3-GalT-KO mice (Tearle et al. 1996; Thall et al. 1996) were immunized subcutaneously with 20 μ g Gal α

(1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α -BSA in 200 μ L phosphate-buffered saline (PBS)/dose/immunization or 20 μ g BSA alone in 200 μ L PBS. All animals were immunized four times at 7-day intervals and sacrificed 14 days after the last immunization. Blood was collected by cardiac puncture, and serum was separated through centrifugation for analysis by CL-ELISA. All animal procedures were performed according to the vertebrate animal protocols A-201211-1 and A-201411-1, approved by the University of Texas at El Paso's Institutional Animal Care and Use Committee.

Supplementary data

Supplementary data for this article is available online at <http://glycob.oxfordjournals.org/>.

Acknowledgements

We are very grateful to Dr Joaquim Gascon and Dr Montserrat Gállego (ISGlobal/Hospital Clinic/Universitat de Barcelona) for kindly providing human sera without identifiers used in this study. We are thankful to the Biomolecule Analysis Core Facility (BACF) at the University of Texas at El Paso (UTEP) for the access to the microplate luminometer and other instruments used in this study.

Funding

This work was supported by a University of Texas at El Paso College of Science Multidisciplinary Pilot Projects and Collaborations grant, a Robert J. Kleberg Jr. and Helen C. Kleberg Foundation grant (to John VandeBerg and ICA), and by NIH grant 1R21AI115451-01 (to ICA and KM). ICA and CRNB are, respectively, Special Visiting Researcher and Visitor PhD (Sandwich) Scholar of the Science Without Borders Program, Brazil. NSS is supported by the "Bridge to the Doctorate" scholarship (NSF grants HRD-1139929). AFM is supported by the CNPq grant # 470737/2013-1. The BACF is supported by the Research Centers in Minority Institutions (RCMI) program, grant 2G12MD007592, to the Border Biomedical Research Center (BBRC) at UTEP, from the National Institutes on Minority Health and Health Disparities (NIMHD), a component of the NIH.

Conflict of interest statement

None declared.

Abbreviations

α 1,3-GalT-KO, α 1,3-galactosyltransferase-knockout; Abs, antibodies; AcSH, thioacetic acid; AIBN, azobisisobutyronitrile; BF₃-Et₂O, boron trifluoride etherate; BSA, bovine serum albumin; Ch anti- α -Gal, anti- α -Gal antibodies purified from sera of patients with chronic Chagas disease; ChD, Chagas disease; CL-ELISA, chemiluminescent-enzyme-linked immunosorbent assay; ChHSP, pooled sera of chronic Chagas disease patients; DBU, 1,8-diazabicycloundec-7-ene; DDQ, 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone; DTBS(OTf)₂, di-*tert*-butylsilyl bis(trifluoromethanesulfonate); FPLC, fast protein liquid chromatography; HF-pyr, hydrogen fluoride in pyridine; HRMS, high resolution mass spectrometry; MALDI-TOF, Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight; NGP, neoglycoprotein; NHSP, normal human serum pool; NHS anti- α -Gal, anti- α -Gal antibodies from sera of healthy individuals; NMR, nuclear magnetic resonance; PBS, phosphate-buffered saline; PMB, *p*-methoxybenzyl; RLU, relative luminescence units; RT, room temperature; TCEP, tris (2-carboxyethyl)phosphine; tGPI-mucins, trypomastigote-derived GPI-mucins; THF, tetrahydrofuran; TMS-OTf, trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate.

References

- Acosta-Serrano A, Hutchinson C, Nakayasu ES, Almeida IC, Carrington M. 2007. Comparison and evolution of the surface architecture of trypanosomatid parasites. In: *Trypanosomes: After the Genome*. Barry JD, Mottram JC, McCullach R, Acosta-Serrano A, editors. Norwich (UK): Horizon Scientific Press. p. 319–337.
- Almeida IC, Covas DT, Soussmunt LM, Travassos LR. 1997. A highly sensitive and specific chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of active *Trypanosoma cruzi* infection. *Transfusion*. 37:850–857.
- Almeida IC, Ferguson MA, Schenkman S, Travassos LR. 1994. Lytic anti- α -galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease recognize novel O-linked oligosaccharides on mucin-like glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J*. 304(Pt 3):793–802.
- Almeida IC, Krautz GM, Krettli AU, Travassos LR. 1993. Glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*: A 74 kD antigen of trypomastigotes specifically reacts with lytic anti- α -galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas disease. *J Clin Lab Anal*. 7:307–316.
- Almeida IC, Milani SR, Gorin PA, Travassos LR. 1991. Complement-mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes by human anti- α -galactosyl antibodies. *J Immunol*. 146:2394–2400.
- Ashmus RA, Schocker NS, Cordero-Mendoza Y, Marques AF, Monroy EY, Pardo A, Izquierdo L, Gallego M, Gascon J, Almeida IC, et al. 2013. Potential use of synthetic α -galactosyl-containing glycotopes of the parasite *Trypanosoma cruzi* as diagnostic antigens for Chagas disease. *Org Biomol Chem*. 11:5579–5583.
- Atassi MZ, Long PM, Beisel K, Sakata S, Peters T Jr, David CS. 1982. Immune recognition of serum albumin—XIV. Cross-reactivity by T-lymphocyte proliferation of subdomains 3, 6 and 9 of bovine serum albumin. *Mol Immunol*. 19:313–321.
- Avila JL, Rojas M, Galili U. 1989. Immunogenic Gal α 1-3Gal carbohydrate epitopes are present on pathogenic American trypanosoma and Leishmania. *J Immunol*. 142:2828–2834.
- Brinkmann N, Malissard M, Ramuz M, Römer U, Schumacher T, Berger EG, Elling L, Wandrey C, Liese A. 2001. Chemo-enzymatic synthesis of the galili epitope Gal α (1 \rightarrow 3)Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc on a homogeneously soluble PEG polymer by a multi-enzyme system. *Bioorg Med Chem Lett*. 11:2503–2506.
- Buscaglia CA, Campo VA, Di Noia JM, Torrecilhas AC, De Marchi CR, Ferguson MA, Frasch AC, Almeida IC. 2004. The surface coat of the mammal-dwelling infective trypomastigote stage of *Trypanosoma cruzi* is formed by highly diverse immunogenic mucins. *J Biol Chem*. 279:15860–15869.
- Crich D, Dudkin V. 2001. Why are the hydroxyl groups of partially protected N-acetylglucosamine derivatives such poor glycosyl acceptors, and what can be done about it? *J Am Chem Soc*. 123:6819–6825.
- Dahmén J, Magnusson G, Hansen HC. 2002. Synthesis of the linear B type 2 trisaccharide Gal α 3Gal β 4GlcNAc β OTMSEt, and coupling of the corresponding 2-carboxyethyl β -thioglycoside to sepharose. *J Carbohydr Chem*. 21:1–12.
- Danac R, Ball L, Gurr SJ, Muller T, Fairbanks AJ. 2007. Carbohydrate chain terminators: Rational design of novel carbohydrate-based antifungal agents. *ChemBioChem*. 8:1241–1245.
- Fang J, Li J, Chen X, Zhang Y, Wang J, Guo Z, Zhang W, Yu L, Brew K, Wang PG. 1998. Highly efficient chemoenzymatic synthesis of α -galactosyl epitopes with a recombinant α (1 \rightarrow 3)-galactosyltransferase. *J Am Chem Soc*. 120:6635–6638.
- Frasch AC. 2000. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today*. 16:282–286.
- Galili U, Wang L, LaTemple DC, Radic MZ. 1999. The natural anti-Gal antibody. *Sub-Cell Biochem*. 32:79–106.
- Gavard O, Hersant Y, Alais J, Duverger V, Dilhas A, Bascou A, Bonnaffé D. 2003. Efficient preparation of three building blocks for the synthesis of heparan sulfate fragments: Towards the combinatorial synthesis of oligosaccharides from hypervariable regions. *Euro J Org Chem*. 2003:3603–3620.
- Gazzinelli RT, Pereira ME, Romanha A, Gazzinelli G, Brener Z. 1991. Direct lysis of *Trypanosoma cruzi*: A novel effector mechanism of protection mediated by human anti-gal antibodies. *Parasite Immunol*. 13:345–356.
- Hanessian S, Saavedra OM, Mascitti V, Marterer W, Oehrlein R, Mak C-P. 2001. Practical syntheses of B disaccharide and linear B type 2 trisaccharide—non-primate epitope markers recognized by human anti- α -Gal antibodies causing hyperacute rejection of xenotransplants. *Tetrahedron*. 57:3267–3280.
- Hendel JL, Wang J-W, Jackson TA, Hardmeier K, De Los Santos R, Auzanneau F-L. 2009. How the substituent at O-3 of N-acetylglucosamine impacts glycosylation at O-4: A comparative study. *J Org Chem*. 74:8321–8331.
- Houseman BT, Gawalt ES, Mrksich M. 2003. Maleimide-functionalized self-assembled monolayers for the preparation of peptide and carbohydrate biochips. *Langmuir*. 19:1522–1531.
- Imamura A, Kimura A, Ando H, Ishida H, Kiso M. 2006. Extended applications of di-*tert*-butylsilylene-directed α -predominant galactosylation compatible with C2-participating groups toward the assembly of various glycosides. *Chem Eur J*. 12:8862–8870.
- Izquierdo L, Marques AF, Gallego M, Sanz S, Tebar S, Riera C, Quintó L, Aldasoro E, Almeida IC, Gascon J. 2013. Evaluation of a chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in a nonendemic setting. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 108:928–931.
- Khamis J, Ashmus RA, Schocker NS, Michael K. 2012. A high-yielding synthesis of allyl glycosides from peracetylated glycosyl donors. *Carbohydr Res*. 357:147–150.
- Kiso M, Anderson L. 1979. Ferric chloride-catalyzed glycosylation of alcohols by 2-acetylamido-2-deoxy- β -D-glucopyranose 1-acetates. *Carbohydr Res*. 72:C12–C14.
- Litjens REJN, Hoogerhout P, Filippov DV, Codée JDC, van den Bos LJ, van den Berg RJBHN, Overkleef HS, van der Marel GA. 2005. Synthesis of an α -Gal epitope α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glc NAc-lipid conjugate. *J Carbohydr Chem*. 24:755–769.
- Macher BA, Galili U. 2008. The Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc-R (α -Gal) epitope: A carbohydrate of unique evolution and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta*. 1780:75–88.
- Makela O, Seppala IJT. 1986. Haptens and carriers. In: Weir DM, editor. *Handbook of Experimental Immunology in Four Volumes*. Oxford (UK): Blackwell Scientific Publications.
- Milani SR, Travassos LR. 1988. Anti- α -galactosyl antibodies in chagasic patients. Possible biological significance. *Braz J Med Biol Res*. 21:1275–1286.
- Plaza-Alexander P, Lowary TL. 2013. Synthesis of trisaccharides incorporating the α -Gal antigen functionalized for neoglycoconjugate preparation. *Arkivoc*. ii:112–122.
- Qian X, Sujino K, Otter A, Palcic MM, Hindsgaul O. 1999. Chemoenzymatic synthesis of α -(1 \rightarrow 3)-Gal(NAc)-terminating glycosides of complex tertiary sugar alcohols. *J Am Chem Soc*. 121:12063–12072.
- Schmidt RR, Michel J. 1980. Facile synthesis of α -O-glycosyl and β -O-glycosyl imidates—preparation of glycosides and disaccharides. *Angew Chem Int Ed*. 19:731–732.
- Sherman AA, Yudina ON, Mironov YV, Sukhova EV, Shashkov AS, Menshov VM, Nifantiev NE. 2001. Study of glycosylation with N-trichloroacetyl-D-glucosamine derivatives in the syntheses of the spacer-armed pentasaccharides sialyl lacto-N-neotetraose and sialyl lacto-N-tetraose, their fragments, and analogues. *Carbohydr Res*. 336:13–46.
- Soares RP, Torrecilhas AC, Assis RR, Rocha MN, Moura e Castro FA, Freitas GF, Murta SM, Santos SL, Marques AF, Almeida IC, et al. 2012. Intraspecies variation in *Trypanosoma cruzi* GPI-mucins: Biological activities and differential expression of α -galactosyl residues. *Am J Trop Med Hyg*. 87:87–96.
- Stevenson DE, Furneaux RH. 1996. Synthesis of allyl β -D-galactopyranoside from lactose using *Streptococcus thermophilus* β -D-galactosidase. *Carbohydr Res*. 284:279–283.
- Tearle RG, Tange MJ, Zannettino ZL, Katerelos M, Shinkel TA, Van Denderen BJW, Lonie AJ, Lyons I, Nottle MB, Cox T, et al. 1996. The

- α -1,3-galactosyltransferase knockout mouse: Implications for xenotransplantation 1. *Transplantation*. 61:13–19.
- Thall AD, Murphy HS, Lowe JB. 1996. Alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient mice produce naturally occurring cytotoxic anti-Gal antibodies. *Transplant Proc*. 28:556–557.
- Travassos LR, Almeida IC. 1993. Carbohydrate immunity in American trypanosomiasis. *Springer Semin Immunopathol*. 15:183–204.
- Vic G, Hao Tran C, Scigelova M, Crout D. H. G. 1997. Glycosidase-catalysed synthesis of oligosaccharides: A one step synthesis of lactosamine and of the linear B type 2 trisaccharide [small alpha]-D-Gal-(1[math>\rightarrow]3)-[small beta]-D-Gal-(1[math>\rightarrow]4)-[small beta]-D-GlcNAcSEt involved in the hyperacute rejection response in xenotransplantation from pigs to man and as the specific receptor for toxin A from *Clostridium difficile*. *Chem Commun*. 169–170.
- Wang Y, Yan Q, Wu J, Zhang L-H, Ye X-S. 2005. A new one-pot synthesis of α -Gal epitope derivatives involved in the hyperacute rejection response in xenotransplantation. *Tetrahedron*. 61:4313–4321.
- Wilkinson SG. 1996. Bacterial lipopolysaccharides—themes and variations. *Prog Lipid Res*. 35:283–343.
- Yoshida T, Chiba T, Yokochi T, Onozaki K, Sugiyama T, Nakashima I. 2001. Synthesis of a set of di- and tri-sulfated galabioses. *Carbohydr Res*. 335:167–180.

Virus-like Particle Display of the α -Gal Epitope for the Diagnostic Assessment of Chagas Disease

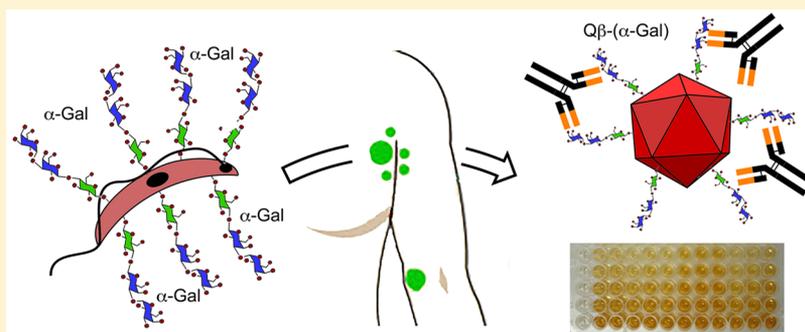
Carlos Ramon Nascimento Brito,[†] Craig S. McKay,[§] Maíra Araújo Azevedo,[†] Luíza Costa Brandão Santos,[†] Ana Paula Venuto,[†] Daniela Ferreira Nunes,[†] Daniella Alchaar D'Ávila,[†] Gisele Macedo Rodrigues da Cunha,[†] Igor Correia Almeida,[‡] Ricardo Tostes Gazzinelli,[†] Lucia Maria Cunha Galvão,[†]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

[†]Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

[‡]Border Biomedical Research Center, Department of Biological Sciences, University of Texas at El Paso, El Paso, Texas 79912, United States

[§]School of Chemistry and Biochemistry, Georgia Institute of Technology, Atlanta, Georgia 30332, United States

Supporting Information



ABSTRACT: The α -Gal antigen [Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α] 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 α -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- α -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 α -Gal-containing glycosylphosphatidylinositol-anchored mucins, the current study also showed concentrations of anti- α -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, diagnostics, ELISA, α -Gal, anti- α -Gal antibodies, treatment assessment, *Trypanosoma cruzi*

Chagas disease (CD), or American trypanosomiasis, is a vector-borne disease caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*.¹ According to the World Health Organization, 6 to 7 million people are estimated to be infected worldwide,² with approximately 5.7 million in Latin America and nearly 30 000 new cases annually by virtue of vector transmission.³ The disease represents a major public health concern and an economic burden because most patients suffer the chronic stage of the disease during their most productive years, in addition to the costs of treatment and vector control strategies.⁴ Human immigration has expanded the distribution of the disease, with data suggesting between 300 000 and 1 million cases in the U.S. alone, in addition to thousands of cases

recorded in other nonendemic countries.^{5–7} In response, nonendemic countries have required immigrants from endemic environments to undergo serological blood screening for *T. cruzi* antibodies.⁸ Medical responses to CD are hampered by questionable diagnostic tools, poor assessment of therapeutic outcomes, and cross reactivity of CD detection reagents with the sera of patients exposed to leishmaniasis, which has a similar geographic distribution. These deficiencies highlight the need for a reliable standard procedure to evaluate *T. cruzi* infection.

Received: June 20, 2016

Published: October 4, 2016

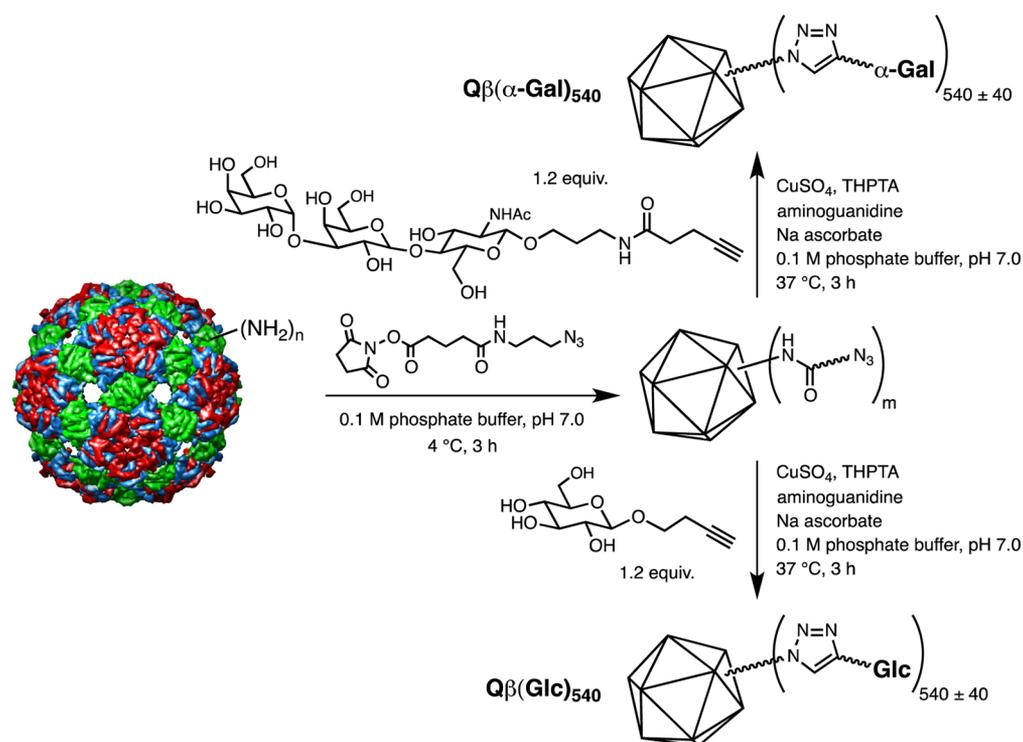


Figure 1. Preparation of $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$: Summary of steps performed to covalently attach the $\alpha\text{-Gal}$ trisaccharide ($\text{Gal}\alpha(1,3)\text{Gal}\beta(1,4)\text{GlcNAc}\beta$) to the VLP by azide–alkyne ligation. The image on the left is a representation of the X-ray crystal structure of the $Q\beta$ particle (from viperdb.scripps.edu).⁴¹

Most CD patients do not report symptoms until much later in life, when the disease reaches the chronic stage; therefore, only those presenting the symptoms of the disease in earlier stages are diagnosed with *T. cruzi* antibodies. At the chronic stage, however, severe pathologies such as myocarditis or digestive megasyndromes may not respond to benznidazole or nifurtimox, the only two drugs available (although not approved by the U.S. Food and Drug Administration) for treatment of Chagas disease in most endemic and nonendemic countries.⁹ Moreover, the diagnosis of *T. cruzi* infection presently requires the use of at least two conventional tests recommended by the World Health Organization. Most available serological tests can produce a considerable number of questionable diagnoses, particularly because of issues of specificity.^{10–14} The conventional serology tests for CD still heavily rely on the use of antigenic preparations derived from epimastigote forms, which are not found in the infected mammalian host. Furthermore, it has been shown that sera from individuals with leishmaniasis, mycoses, or certain autoimmune disorders cross-react with these crude antigenic preparations.^{15–18} These tests show disparities in reproducibility and reliability that can also be credited to the nonoptimal standardization of reagents, including *T. cruzi* antigens.¹⁰

In contrast, tests using semipurified or purified antigens from infective mammalian tissue culture-derived trypomastigote (TCT) forms usually perform much better. For example, trypomastigote excreted–secreted antigens (TESAs) give rise to increased sensitivity and specificity and decreased cross-reactivity with other pathogens.^{10,19,20} Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored mucins purified from TCT forms (tGPI-mucins) have been highly effective in ELISA-based assays of *T. cruzi* infection, including follow-up analyses of treated patients.^{17,18,21–24} However, the purification of these

glycoproteins is time-consuming and laborious, severely hampering their use in primary or confirmatory routine CD diagnosis.

The trisaccharide $\text{Gal}\alpha(1,3)\text{Gal}\beta(1,4)\text{GlcNAc}\alpha$ ($\alpha\text{-Gal}$) is an immunodominant antigen highly expressed on the *T. cruzi* parasite surface, mainly in tGPI-mucins of the trypomastigote infective form.^{25–27} Approximately 3% of the IgG antibodies from patients chronically infected by *T. cruzi* are directed against the $\alpha\text{-Gal}$ glycotope,^{17,28–30} an even greater fraction than the approximately 1% of anti- $\alpha\text{-Gal}$ antibodies present in healthy individuals.³¹ Synthetic $\alpha\text{-Gal}$ glycotopes linked to bovine serum albumin (BSA) have been recently used for the recognition of pooled sera from patients with chronic CD, showing promising results, and may be further explored as diagnostic antigens for *T. cruzi* infection and follow-up to CD chemotherapy.^{32,33} The evaluation of treatment in the chronic phase is controversial and difficult to validate because there are no established criteria or biomarkers for treatment success during this stage. However, in a clinical study with adolescents and children with recent chronic CD, purified tGPI-mucins were successfully used to evaluate seroconversion for lytic anti- $\alpha\text{-Gal}$ antibodies after treatment with benznidazole in approximately 85% of the patients and to correlate those observations with disease progression. Although promising, this approach is limited in part to the technical difficulties of purification of tGPI-mucins on a large scale for routine use.^{22,23,27}

Therefore, a cost-effective, highly sensitive, and specific diagnostic tool for Chagas disease is needed. Toward this end, we chose to focus on increasing the density and accessibility of $\alpha\text{-Gal}$ epitopes displayed on a stable and addressable nanoparticle platform to increase the binding avidity and specificity of serum antibodies. Using the virus-like particle

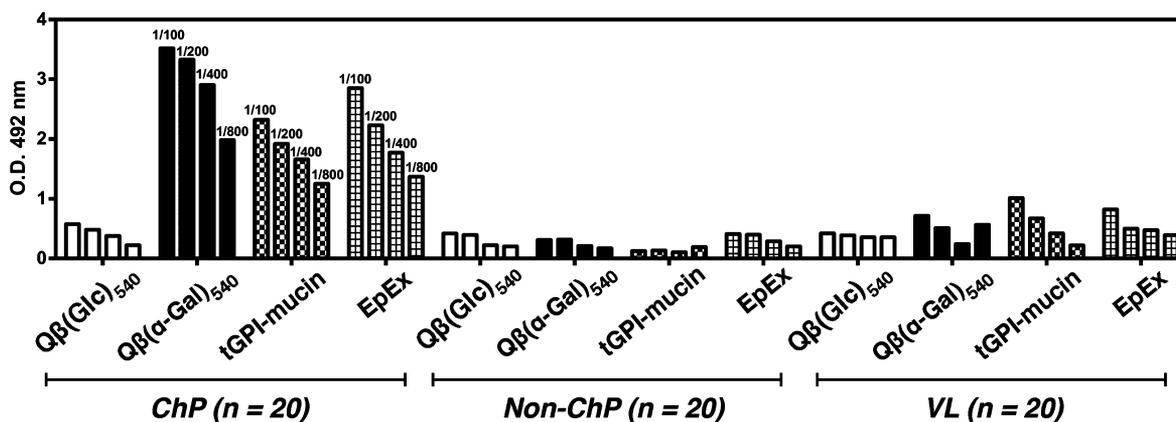


Figure 2. Antigenicity of blind-selected pooled sera against the indicated antigens, which were plated at the following concentrations: $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$ (125 ng/mL), tGPI-mucin (2.5 $\mu\text{g/mL}$), and EpEx (5 $\mu\text{g/mL}$). $Q\beta(\text{Glc})_{540}$ was used as an antigen control (plated at 125 ng/mL). Each experiment was performed with four serial dilutions (left to right) at 1/100, 1/200, 1/400, and 1/800. The optical density (O.D.) was measured at 492 nm.

(VLP) derived from the $Q\beta$ bacteriophage as such an easily produced scaffold, we hoped that the display of multiple copies of $\alpha\text{-Gal}$ would improve the capture of antibodies induced by exposure to *T. cruzi*, therefore enabling us to more sensitively detect infection and follow the effectiveness of benznidazole treatment. We report here the preliminary success of this strategy, suggesting that it may be useful for the screening of CD for treatment and blood bank purposes.

RESULTS

Study Population. A total of 161 human serum samples of Brazilian patients and healthy donors were acquired for testing, as described in detail in the [Supporting Information](#). Patients were identified as positive to CD by at least two serological tests, PCR assay, and clinical examination (Doppler echocardiogram, 12 lead electrocardiogram, and chest X-ray).⁸ In total, 61 serum samples came from patients infected with *T. cruzi* from an endemic area of Minas Gerais and who had not been treated with benznidazole. These patients displayed a range of chronic Chagas cardiomyopathy conditions (CCC1–CCC5) as well as an indeterminate form, and the serum samples displayed either positive or negative parasitemia. Sera were also collected from five treated patients at different times post-infection and post-treatment. More information regarding these five sera can be found in ref 34. Four additional patients, two treated with benznidazole and two untreated, were followed over 24 months, and serum samples were collected every 6 months to measure the anti- $\alpha\text{-Gal}$ antibody titer. The sample set also included sera from 45 healthy individuals with no history of CD and sera from 46 patients positive for visceral leishmaniasis (VL).

Functionalized $Q\beta$ Virus-like Particles. Virus-like particles are noninfectious capsid protein assemblies that lack the replicative genome of the virus from which they are adapted. The $Q\beta$ VLP platform was isolated in large quantities (approximately 150 mg of purified particles per liter of shaker-flask culture) as the assembled icosahedral structure from *E. coli* expression of the 132 amino acid truncated coat protein. The functionalized particles were prepared as shown in [Figure 1](#) and as described previously,³⁵ involving the installation of a short azide-terminated linker on the capsid surface followed by the copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition connection of an $\alpha\text{-Gal}$ -alkyne derivative.³⁶ An average of 540 $\alpha\text{-Gal}$ units were found to be attached per particle by mass

spectrometry analysis, with the capsid structures remaining intact and highly stable to extended storage. Note that the alkyne-terminated chain in the $\alpha\text{-Gal}$ -alkyne is connected via a β -linkage to the GalNAc residue, whereas in tGPI-mucins an α -linkage is made from GalNAc to the Thr residue.

Preparation of Known Reagents. Epimastigote forms (Y strain) were cultured in cell-free liver-infusion tryptose (LIT) medium,³⁷ and epimastigote crude extract (EpEx) was prepared from these parasites as previously described.¹⁷ *T. cruzi* bloodstream trypomastigote forms (Y strain) were obtained and maintained in BALB/c mice. tGPI-mucins were purified from these parasite forms and quantified by *myo*-inositol analysis, as previously described.^{27,38–40}

Serological Testing. The reactivity of 161 sera of patients (infected or not by *T. cruzi*) against $\alpha\text{-Gal}$ was evaluated by colorimetric ELISA using tGPI-mucins and $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$ antigens; EpEx does not contain $\alpha\text{-Gal}$ epitopes and was used as a control. The assay was benchmarked against samples of known status: pooled sera from untreated chronic CD patients as a positive control ($n = 20$, designated as ChP), pooled sera from non-CD healthy donors as negative control ($n = 20$, designated non-ChP), and pooled sera from patients with visceral leishmaniasis ($n = 20$, designated VL). Antigen concentrations used per assay and the dilution of the serum samples were chosen from a series of experiments to determine the conditions giving the highest ratios of signal from ChP vs non-ChP and VL. Glucose-displaying particle $Q\beta(\text{Glu})_{540}$ was used as an antigen control.

For $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$, the prime antigenicity point was reached at a concentration of 125 ng/mL (6.25 ng/well). For the tGPI-mucin and EpEx antigens, the best profiles were reached at concentrations of 2.5 $\mu\text{g/mL}$ (125 ng/well) and 5 $\mu\text{g/mL}$ (250 ng/well), respectively. Although we tested a series of seven dilutions (from 1/100 to 1/6400) for all three pooled sera samples, the highest ratios for antigens $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$, tGPI-mucin, and EpEx were obtained when the ChP sera were diluted between 1/100 and 1/800.

The response of all three antigens with non-ChP and VL sera were much lower than observed with ChP sera. The serum response to $Q\beta(\text{Glu})_{540}$ was insignificant compared to $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$, showing terminal $\alpha\text{-Gal}$ specificity in the immune response of infected patients ([Figure 2](#)). Furthermore, a significantly greater reactivity of ChP sera and a significantly

lower cross-reactivity of the VL sera were observed with the $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$ antigen than with EpEx or tGPI-mucins.

ELISA analyses were performed on individual serum samples, as shown in Figure 3A–C. Sera from individuals belonging to

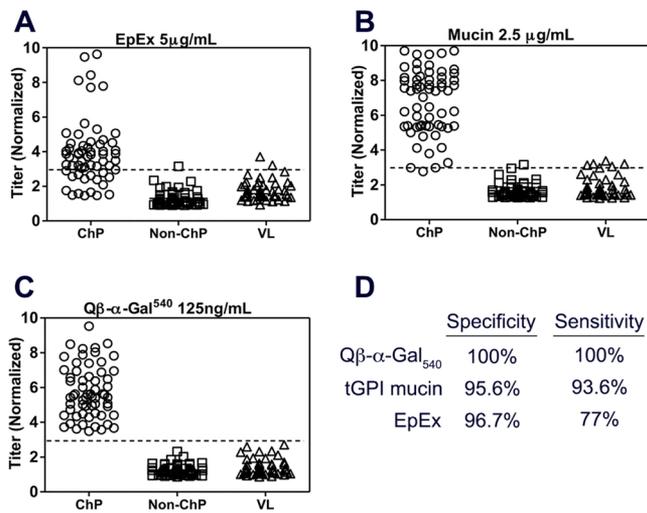


Figure 3. Individual serum screening. The reactivity of sera collected from untreated CD patients (ChP) with *T. cruzi* ($n = 61$), from non-Chagasic patients (non-ChP) or healthy donors ($n = 45$), and from patients infected with *Leishmania infantum* (VL) ($n = 46$) was used against the following antigens: (A) total lysate epimastigotes antigen EpEx (deposited at $5 \mu\text{g/mL}$), (B) purified tGPI-mucin (deposited at $2.5 \mu\text{g/mL}$), and (C) carbohydrate antigen $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$ (deposited at 125 ng/mL). (D) Specificity (true negative/true negative + false positive) and sensitivity (true positive/true positive + false negative) for the antigens employed above. For panels A–C, the results were normalized to a 1-to-10 scale by the following equation: normalized value = $1 + [9(x - A)/(B - A)]$, where A is the minimal observed value, B is the maximum observed value, and x is the observed value. Cut-off values (horizontal dotted lines) are defined as the mean plus 2 times the standard deviation of the negative control results (non-ChP).

the ChP, non-ChP, and VL groups and those not receiving any kind of treatment reacted to all three antigens with similar profiles, as expected, but with different sensitivities. Sera from individuals with CD (not treated with benznidazole) had a strong response to the $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$ antigen and produced the best non-cross-reactivity results. Indeed, using $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$, the distance of the serum titers obtained for the lowest reactive

CD individuals (not treated) to individuals from the VL and non-ChP groups (also not treated) was greater than the distance obtained for the individual serum samples tested against tGPI-mucin and EpEx antigens. As shown in Figure 3D, the specificity and sensitivity of $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$ were significantly better than for the EpEx antigen or tGPI-mucin.⁴²

ChP individuals not receiving any kind of treatment were categorized according to their chronic Chagas cardiomyopathy (CCC), parasitemia, and age. Sera collected from each of these patients was tested for anti- $\alpha\text{-Gal}$ antibodies using $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$, and the results were plotted against CCC in Figure 4A, parasitemia in Figure 4B, and age in Figure 4C. No correlation was found for any of these measures, indicating that untreated patients have high levels of anti- $\alpha\text{-Gal}$ antibodies throughout the course of infection.

Individual serum samples from two chronic CD patients receiving benznidazole were collected at 1, 6, 12, 18, and 24 months post-treatment. Sera from two other chronic CD patients not receiving treatment were collected at the same time. These samples were tested using $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$ showing the treated patients to exhibit a significant and sustained decrease in the anti- $\alpha\text{-Gal}$ antibody titer relative to the untreated patients (Figure 5A). In a second test, individual

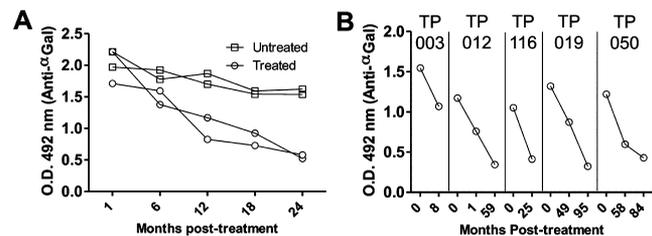


Figure 5. Follow-up ELISA assay. (A) Serum from two patients was collected 1, 6, 12, 18, and 24 months post-treatment with benznidazole (\circ) collected from two untreated patients at the same time as for the treated ones (\square). (B) Serum reaction of five infected and treated patients collected at different times (in months) post-treatment with benznidazole. Patients were identified in accordance with the date of collected serum. TP 003 = treated patients number 003; others are noted similarly.

serum samples collected at different time points from five other treated chronic CD patients were tested by ELISA against $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$ and were also found to show a decrease in the anti- $\alpha\text{-Gal}$ response after benznidazole treatment. This pattern persisted for long periods as represented by patient TP019,

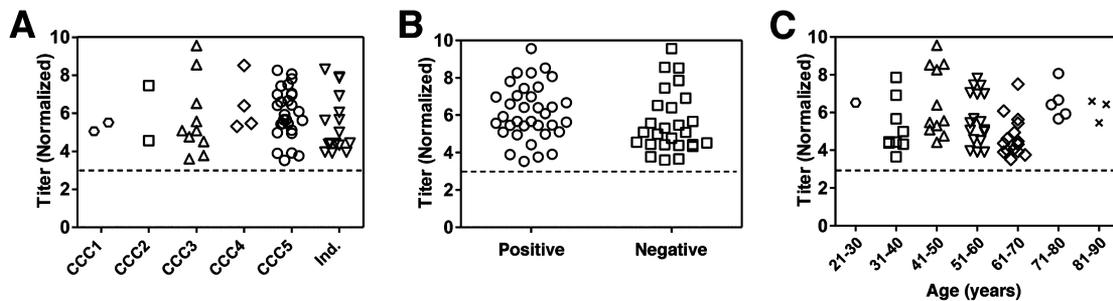


Figure 4. Recognition of the sera from untreated patients infected by *T. cruzi*. All 61 sera of untreated patients were used for recognition only for the $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$ antigen, considering (A) the chronicity of the disease, (B) parasitemia, and (C) the age of the patients. Serum was used at a dilution of $1/800$, and $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$ antigen was used at 125 ng/mL . Chronicity follows $\text{CCC5} > \text{CCC4} > \text{CCC3} > \text{CCC2} > \text{CCC1}$, where CCC represents chronic cardiomyopathy conditions and Ind. stands for indeterminate. Cut-off values (horizontal dotted lines) are defined as the mean plus 2 times the standard deviation of the negative control results (non-ChP).

who was followed for 95 months. These results may be compared to previous reports in which patients were followed using purified tGPI-mucins.^{22,23} These studies described a treatment-correlated reduction in the titers of lytic antibodies,²² which are produced in response to α -Gal-containing molecules present on the parasite surface.^{27,43} Thus, the $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$ antigen provides very similar results, allowing the assessment of drug efficacy or failure by the convenient quantitation of anti- α -Gal antibody production over extended time periods during and after treatment.

DISCUSSION

Different antigens have been used for the diagnosis of *T. cruzi* infection, but no test is currently regarded as a gold standard. The genetic diversity observed among different *T. cruzi* strains may decrease the sensitivity and specificity of existing diagnostic tests. For example, a high discrepancy among commercial ELISA serological tests was recently reported in Central Veracruz, Mexico, revealing a limited ability to detect *T. cruzi* infection in the study population for that region.¹³ The use of quantitative PCR methods to detect the *T. cruzi* parasite in peripheral blood has been recently found to have impressive sensitivity⁴⁴ and moderate⁴⁴ to excellent specificity vs non-infected controls.⁴⁵ However, these methods are expensive and not currently scalable in diverse settings.

The α -Gal antigen represents an excellent target for serological evaluation for the following reasons.⁴⁶ First, it is highly expressed in the infective trypomastigote stage of *T. cruzi* and is the main epitope responsible for the production of high levels of protective anti- α -Gal antibodies in patients infected by the parasite.^{26,28,47} In contrast, the antibodies against α -Gal that are present in high concentrations in all healthy individuals^{31,48} are directed against terminal α -Gal residues present in different core oligosaccharides or O-antigens of lipopolysaccharide from Gram-negative bacteria.⁴⁹ These normal anti- α -Gal antibodies do not specifically recognize *T. cruzi* and have little trypanolytic power.^{27,28} Second, we show here that the Ch anti- α -Gal antibody levels can be modulated by various kinds or sources of exposure. Third, the genetic diversity of *T. cruzi* does not abrogate α -Gal antigen presentation, making the ELISA-type assay used here likely relevant to all strains. We also showed this in separate experiments using FITC-labeled MOA lectin, which binds specifically to terminal α -Gal disaccharide Gal α 1,3Gal.^{50,51} Consistent with previous reports,^{21,52,53} we found this residue on the surface of different discrete typing units (DTUs) of *T. cruzi*, such as the Colombiana strain (TcI), 32%; Y strain (TcII), 60%; Arequipa strain (TcII), 72%; and CL-Brener strain (TcVI), 58% (Supporting Information).

A frequent problem in the diagnosis of *T. cruzi* infection is the possibility of false positive or false negative results as well as cross-reactions with other trypanosomatids. In addition to other examples of their use,^{17,18,21} the tGPI-mucin and EpEx antigens were employed as controls in a study using a recombinant mucin-like molecule, termed trypomastigote small surface antigen (TSSA), for diagnostic purposes.¹⁸ That report showed GST-TSSA to have a specificity of 94.4% and a sensitivity of 86.9% in the analysis of human control sera, figures that are not acceptable for effective disease diagnosis or treatment evaluation.

Thus, the ability of the $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$ particle to differentiate Chagas disease patients from others, including those with leishmaniasis, with complete specificity and high sensitivity in these studies is promising. We speculate that the unprece-

dent level of discrimination provided by $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$ may result from two factors. First, the significantly higher density of trisaccharide presentation on the VLP is likely to induce more efficient antigen-antibody binding even in cases of patients with low anti α -Gal antibody production beyond normal threshold levels. Second, the α -Gal-VLP conjugate is highly homogeneous in composition, presenting no other glycan epitope or disease-related peptide, protein, or lipid. This is likely to enhance the specificity as well.

Our tests of sera from untreated patients at different stages of infection showed no difference in anti α -Gal levels for variations in the severity of clinical manifestations, the presence or lack of circulating blood parasites, and the age of the patients. This finding is important because it suggests that the VLP-based test will be useful for the majority of individuals infected by *T. cruzi*, who are asymptomatic or chronically infected and thereby exhibit low parasitemia.^{4,8}

Most important for potential applications in the field is the finding that all patients previously identified by more laborious methods as being positive for *T. cruzi* exposure were correctly identified by this simple ELISA test, and all patients not exposed, or infected with a related trypanosome, were correctly identified as CD-negative. Therefore, low or negative serological results using the $Q\beta(\alpha\text{-Gal})_{540}$ antigen may be uniquely useful as a criterion of cure or remission of Chagas disease.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acsinfectdis.6b00114.

Details of study population, experimental details of reagent preparation and characterization, and experimental details for serological analyses (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: mgfinn@gatech.edu.

*E-mail: amarques@icb.ufmg.br, marques.af@outlook.com.

Author Contributions

C.R.N.B. and C.S.M. contributed equally.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ no. 470737/2013-1) and by the Georgia Institute of Technology and the National Institutes of Health (R01 CA149451). I.C.A. is partially supported by NIH/NIMHD grant 2G12MD007592

REFERENCES

- (1) Chagas, C. R. J. (1909) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1, 159–218.
- (2) WHO, No. 340; World Health Organization: 2015.
- (3) WHO (2015) *Wkly Epidemiol Rec* 90, 33–43.
- (4) Moncayo, A., and Silveira, A. C. (2009) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104 (Suppl 1), 17–30.
- (5) Hotez, P. J. (2008) *PLoS Neglected Trop. Dis.* 2, e256.
- (6) Bern, C., Kjos, S., Yabsley, M. J., and Montgomery, S. P. (2011) *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 655–681.

- (7) Bern, C., and Montgomery, S. P. (2009) *Clin. Infect. Dis.* 49, e52–e54.
- (8) Nunes, M. C. P., Dones, W., Morillo, C. A., Encina, J. J., and Ribeiro, A. L. (2013) *J. Am. Coll. Cardiol.* 62, 767–776.
- (9) Urbina, J. A. (2015) *J. Eukaryotic Microbiol.* 62, 149–156.
- (10) da Silveira, J. F., Umezawa, E. S., and Luquetti, A. O. (2001) *Trends Parasitol.* 17, 286–291.
- (11) Umezawa, E. S., Nascimento, M. S., and Stolf, A. M. (2001) *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 39, 169–176.
- (12) Afonso, A. M., Ebell, M. H., and Tarleton, R. L. (2012) *PLoS Neglected Trop. Dis.* 6, e1881.
- (13) Guzman-Gomez, D., Lopez-Monteon, A., de la Soledad Lagunes-Castro, M., Alvarez-Martinez, C., Hernandez-Lutzon, M. J., Dumonteil, E., and Ramos-Ligonio, A. (2015) *Parasites Vectors* 8, 466.
- (14) Brasil, P. E., Castro, R., and Castro, L. (2016) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 111, 1–19.
- (15) Araujo, F. G. (1986) *Infect. Immun.* 53, 179–185.
- (16) Schnaidman, B. B., Yoshida, N., Gorin, P. A., and Travassos, L. R. (1986) *J. Protozool.* 33, 186–191.
- (17) Almeida, I. C., Covas, D. T., Soussumi, L. M., and Travassos, L. R. (1997) *Transfusion* 37, 850–857.
- (18) De Marchi, C. R., Di Noia, J. M., Frasc, A. C., Amato Neto, V., Almeida, I. C., and Buscaglia, C. A. (2011) *Clin. Vaccine Immunol.* 18, 1850–1855.
- (19) Zarate-Blades, C. R., Blades, N., Nascimento, M. S., da Silveira, J. F., and Umezawa, E. S. (2007) *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 57, 229–232.
- (20) Furucho, C. R., Umezawa, E. S., Almeida, I., Freitas, V. L., Bezerra, R., Nunes, E. V., Sanches, M. C., Guastini, C. M., Teixeira, A. R., and Shikanai-Yasuda, M. A. (2008) *Trop. Med. Int. Health* 13, 1527–1533.
- (21) Izquierdo, L., Marques, A. F., Gallego, M., Sanz, S., Tebar, S., Riera, C., Quinto, L., Aldasoro, E., Almeida, I. C., and Gascon, J. (2013) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108, 928–931.
- (22) de Andrade, A. L., Martelli, C. M., Oliveira, R. M., Silva, S. A., Aires, A. I., Soussumi, L. M., Covas, D. T., Silva, L. S., Andrade, J. G., Travassos, L. R., and Almeida, I. C. (2004) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71, 594–597.
- (23) Sgambatti de Andrade, A. L., Zicker, F., de Oliveira, R. M., Almeida Silva, S., Luquetti, A., Travassos, L. R., Almeida, I. C., de Andrade, S. S., de Andrade, J. G., and Martelli, C. M. (1996) *Lancet* 348, 1407–1413.
- (24) Pinazo, M. J., Posada Ede, J., Izquierdo, L., Tassies, D., Marques, A. F., de Lazzari, E., Aldasoro, E., Munoz, J., Abras, A., Tebar, S., Gallego, M., de Almeida, I. C., Reverter, J. C., and Gascon, J. (2016) *PLoS Neglected Trop. Dis.* 10, e0004269.
- (25) Acosta-Serrano, A.; Hutchinson, C.; Nakayasu, E. S.; Almeida, I. C.; Carrington, M. Comparison and evolution of the surface architecture of trypanosomatid parasites. In *Trypanosomes: After the Genome* Barry, M. R., Mottram, J. C., and Acosta-Serrano, A., Eds.; Horizon Scientific Press: Norwich, U.K., 2007; pp 319–337.
- (26) Travassos, L. R., and Almeida, I. C. (1993) *Springer Semin. Immunopathol.* 15, 183–204.
- (27) Almeida, I. C., Ferguson, M. A., Schenkman, S., and Travassos, L. R. (1994) *Biochem. J.* 304 (Pt 3), 793–802.
- (28) Almeida, I. C., Milani, S. R., Gorin, P. A., and Travassos, L. R. (1991) *J. Immunol.* 146, 2394–2400.
- (29) Avila, J. L., Rojas, M., and Galili, U. (1989) *J. Immunol.* 142, 2828–2834.
- (30) Milani, S. R., and Travassos, L. R. (1988) *Braz. J. Med. Biol. Res.* 21, 1275–1286.
- (31) Galili, U. (2013) *Immunology* 140, 1–11.
- (32) Ashmus, R. A., Schocker, N. S., Cordero-Mendoza, Y., Marques, A. F., Monroy, E. Y., Pardo, A., Izquierdo, L., Gallego, M., Gascon, J., Almeida, I. C., and Michael, K. (2013) *Org. Biomol. Chem.* 11, 5579–5583.
- (33) Schocker, N. S., Portillo, S., Brito, C. R., Marques, A. F., Almeida, I. C., and Michael, K. (2016) *Glycobiology* 26, 39–50.
- (34) D'Avila, D. A., Macedo, A. M., Valadares, H. M., Gontijo, E. D., de Castro, A. M., Machado, C. R., Chiari, E., and Galvao, L. M. (2009) *J. Clin. Microbiol.* 47, 1718–1725.
- (35) Fiedler, J. D., Brown, S. D., Lau, J. L., and Finn, M. G. (2010) *Angew. Chem., Int. Ed.* 49, 9648–9651.
- (36) Hong, V., Presolski, S. I., Ma, C., and Finn, M. G. (2009) *Angew. Chem., Int. Ed.* 48, 9879–9883.
- (37) Camargo, E. P. (1964) *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 6, 93–100.
- (38) Schenkman, S., Ferguson, M. A. J., Heise, N., Dealmeida, M. L. C., Mortara, R. A., and Yoshida, N. (1993) *Mol. Biochem. Parasitol.* 59, 293–303.
- (39) Redman, C. A., Green, B. N., Thomas-Oates, J. E., Reinhold, V. N., and Ferguson, M. A. (1994) *Glycoconjugate J.* 11, 187–193.
- (40) Redman, C. A., Thomas-Oates, J. E., Ogata, S., Ikehara, Y., and Ferguson, M. A. (1994) *Biochem. J.* 302 (Pt 3), 861–865.
- (41) Golmohammadi, R., Fridborg, K., Bundule, M., Valegard, K., and Liljas, L. (1996) *Structure* 4, 543–554.
- (42) Although the use of the same colorimetric ELISA protocol with all reagents allows us to identify the polyvalent α -Gal virus-like particle as a superior diagnostic reagent, it should be noted that a chemiluminescent ELISA assay has previously shown excellent sensitivity and specificity with tGPI-mucins (refs 17 and 18).
- (43) Galvao, L. M., Nunes, R. M., Cancado, J. R., Brenner, Z., and Krettli, A. U. (1993) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87, 220–223.
- (44) Ramirez, J. C., Cura, C. I., Moreira, O. D., Lages-Silva, E., Juiz, N., Velazquez, E., Ramirez, J. D., Alberti, A., Pavia, P., Flores-Chavez, M. D., Munoz-Calderon, A., Perez-Morales, D., Santalla, J., Guedes, P. M. D., Peneau, J., Marcet, P., Padilla, C., Cruz-Robles, D., Valencia, E., Crisante, G. E., Greif, G., Zulantay, I., Costales, J. A., Alvarez-Martinez, M., Martinez, N. E., Villarreal, R., Villarreal, S., Sanchez, Z., Bisio, M., Parrado, R., Galvao, L. M. D., da Camara, A. C. J., Espinoza, B., de Noya, B. A., Puerta, C., Riarte, A., Diosque, P., Sosa-Estani, S., Guhl, F., Ribeiro, I., Aznar, C., Britto, C., Yadon, Z. E., and Schijman, A. G. (2015) *J. Mol. Diagn.* 17, 605–615.
- (45) Melo, M. F., Moreira, O. C., Tenorio, P., Lorena, V., Lorena-Rezende, I., Oliveira, W., Gomes, Y., and Britto, C. (2015) *Parasites Vectors* 8, 154.
- (46) Pinazo, M. J., Thomas, M. C., Bustamante, J., Almeida, I. C., Lopez, M. C., and Gascon, J. (2015) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110, 422–432.
- (47) Almeida, I. C., Camargo, M. M., Procopio, D. O., Silva, L. S., Mehlert, A., Travassos, L. R., Gazzinelli, R. T., and Ferguson, M. A. (2000) *EMBO J.* 19, 1476–1485.
- (48) Rother, R. P., and Squinto, S. P. (1996) *Cell* 86, 185–188.
- (49) Wilkinson, S. G. (1996) *Prog. Lipid Res.* 35, 283–343.
- (50) Winter, H. C., Mostafapour, K., and Goldstein, I. J. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 14996–15001.
- (51) Loganathan, D., Winter, H. C., Judd, W. J., Petryniak, J., and Goldstein, I. J. (2003) *Glycobiology* 13, 955–960.
- (52) Almeida, I. C., Krautz, G. M., Krettli, A. U., and Travassos, L. R. (1993) *J. Clin. Lab. Anal.* 7, 307–316.
- (53) Soares, R. P., Torrecilhas, A. C., Assis, R. R., Rocha, M. N., Moura e Castro, F. A., Freitas, G. F., Murta, S. M., Santos, S. L., Marques, A. F., Almeida, I. C., and Romanha, A. J. (2012) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 87, 87–96.

Virus-Like particle display of the α -Gal epitope for diagnostic assessment of Chagas disease

Carlos Ramon Nascimento Brito, Craig S. McKay, Máira Araújo Azevedo, Luíza Costa Brandão Santos, Ana Paula Venuto, Daniela Ferreira Nunes, Daniella Alchaar D'A'vila, Gisele Macedo Rodrigues da Cunha, Igor Correia Almeida, Ricardo Tostes Gazzinelli, Lucia Maria Cunha Galvão, Egler Chiari, Carlos Sanhueza, M.G., Finn, Alexandre Ferreira Marques

Supporting Information

Study population

A panel of 161 human serum samples of patients and healthy donors were acquired for testing, up to 157 from Minas Gerais State in collaboration with Hospital das Clinicas, Medical School, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brazil, and four from the Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRG, Rio Grande do Norte State, Brazil. The use of human serum was approved by the Research Ethics Committee of Institution, under the protocol number (Project CAAE: 0559.0.203.000-11/2012) Patients were identified as positive to CD by at least two serological tests, PCR assay, and by clinical examination (Doppler echocardiogram, 12 lead-electrocardiogram, and chest X ray). This clinical information is summarized in Tables S1-S3.

Table S1. Clinical information, Chagas disease patients from Minas Gerais State, Brazil.

Chronic Chagas Cardiomyopathy (CCC) condition	Number of patients	Patient age (Parasitemia)
CCC1	n=2	29(+), 61(+)
CCC2	n=2	51(+), 59(+)
CCC3	n=10	38(-), 45(+), 52(+), 53 (+), 55(+), 62(-), 64(-), 72(-), 81(-), 85(-)
CCC4	n=4	44(+), 49(+), 57(+), 60(+)
CCC5	n=27	42(+), 48(-), 49(+), 52(+), 57(-), 57(-), 58(+), 59(-), 59(+), 60(-), 60(-), 60(+), 61(-), 62(-), 62(-), 62(+), 63(+), 63(+), 63(-), 63(+), 64(+), 65(+), 70(+), 71(+), 73(-), 74(+), 82(+)
Indeterminate	n=16	37(+), 38(+), 39(+), 40(-), 40(-), 40(-), 41(-), 42(+), 42(+), 45(-), 46(-), 56(-), 60(-), 63(-), 66(+), 74(+)

Table S2. Clinical information, treated Chagas disease patients, and patients seronegative for *T. cruzi* (all from Minas Gerais)

Patient ID	Benzimidazole treated patients	Number of patients	Patient Age	Parasitemia
TP 116	Indeterminate	n=5	20	N/A
TP 003	Indeterminate		27	
TP 050	Indeterminate		39	
TP 019	Cardiac		45	
TP 012	Indeterminate		51	
Seronegative for <i>T. cruzi</i>				
N/A	Normal Human Serum (NHS)	n=45	N/A	N/A
N/A	Visceral <i>Leishmaniasis</i> (VL)	n=46	N/A	N/A

Table S3. Clinical information, Chagas disease patients from Rio Grande do Norte, Brazil. Parasitemia status not available.

Patient ID	Chronic Chagas Cardiomyopathy (CCC) condition	Number of patients	Patient Age
RN1	CCC2 (untreated)	n=1	38
RN2	CCC1 (untreated)	n=1	55
RN3	Indeterminate (treated with benzimidazole)	n=1	45
RN4	Indeterminate (treated with benzimidazole)	n=1	69

Each *T. cruzi*-infected patient was classified based on the criteria established at the Center of Parasitic Disease Treatment, School of Medicine, Biological Science Institute, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil, as previously described.¹ It is not unusual for chronic patients to present positive parasitemia when sequential highly sensitive qPCR is used for parasitemia assessment.² All *T.*

1. Rocha, M.O.; Teixeira, M.M.; Ribeiro, A.L. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2007**, *5*, 727-743.
2. (a) Qvarnstrom, Y.; Schijman, A.G.; Veron, V.; Aznar, C.; Steurer, F.; da Silva, A.J. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6*, e1689. (b) Duffy, T.; Cura, C.I.; Ramirez, J.C.; Abate, T.; Cayo, N.M.; Parrado, R.; Bello, Z.D.; Velazquez, E.; Munoz-Calderon, A.; Juiz, N.A.; Basile, J.; Garcia, L.; Riarte, A.; Nasser, J.R.; Ocampo, S.B.; Yadon, Z.E.; Torrico, F.; de Noya, B.A.; Ribeiro, I.; Schijman, A.G. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*, e2000. (c) Ramirez, J.C.; Cura, C.I.; da Cruz Moreira, O.; Lages-Silva, E.; Juiz, N.; Velazquez, E.; Ramirez, J.D.; Alberti, A.; Pavia, P.; Flores-Chavez, M.D.; Munoz-Calderon, A.; Perez-Morales, D.; Santalla, J.; Marcos da Matta Guedes, P.; Peneau, J.; Marcet, P.; Padilla, C.; Cruz-Robles, D.; Valencia, E.; Crisante, G.E.; Greif, G.; Zulantay, I.; Costales, J.A.; Alvarez-Martinez, M.; Martinez, N.E.; Villarroel, R.; Villarroel, S.; Sanchez, Z.; Bisio, M.; Parrado, R.; Maria da Cunha Galvao, L.; Jacome da Camara, A.C.; Espinoza, B.; Alarcon de Noya, B.; Puerta, C.; Riarte, A.; Diosque, P.; Sosa-Estani, S.; Guhl, F.; Ribeiro, I.; Aznar, C.; Britto, C.; Yadon, Z.E.; Schijman, A.G. *J. Mol. Diagn.* **2015**, *17*, 605-615.

cruzi infected patients have positive serology for IgG, employing at least two different methods, in agreement with the Brazilian Consensus in Chagas Disease, 2005.³

Parasites and total epimastigotes extract preparation

Tissue culture cell-derived trypomastigote forms of *T. cruzi* (Y strain, *Tc I* lineage) were obtained 5 to 9 days after infection of monolayers of green monkey kidney LLC-MK₂ epithelial cells (ATCC, Manassas, VA), maintained at 37 °C under 5% CO₂ atmosphere in DMEM supplemented with 10% FBS, as described by Andrews and Colli.⁴ *T. cruzi* trypomastigotes were maintained by weekly transfer in Balb/c inbred mice. Epimastigotes from the same strain were cultured in Liver Infusion Tryptose (LIT) medium containing 10% FBS and 0.0025% hemin.⁵ A total epimastigote extract (EpEx) was obtained as described previously.⁶

Mucin purification

Trypomastigote mucins were obtained according to Almeida et al.,⁷ with minor modifications. Briefly, a parasite pellet containing 1×10^{10} TCTs were delipidated three times with 10 volumes of chloroform:methanol:water (1:2:0.8, v/v/v), followed by chloroform:methanol (2:1, v/v). Between each extraction, insoluble cell debris was separated from the organic phase by centrifugation at $2,000 \times g$ for 20 min at room temperature. The final parasite pellet was dried under a nitrogen stream followed by extraction with 10 volumes of 1-butanol-saturated water (9% 1-butanol) for 16-18 h at 4 °C, under shaking. The soluble phase was separated by centrifugation. This step was repeated three times and the resulting extracts were combined, lyophilized, dissolved in 5% 1-propanol, and applied onto a POROS R2/10 (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA) column (0.46×10 cm) at a flow rate of 1 mL/min in a HPLC system (Waters Corp., Milford, MA). The resulting HPLC fractions were tested by CL-ELISA using Ch anti- α -Gal IgG to detect the presence of mucins. Pooled mucin-containing fractions were dried in a vacuum centrifuge and stored at -20 °C. Mucins were quantified by their myo-inositol content and used for ELISA assay.

PCR and hemoculture procedures

DNA for PCR was obtained as previously described.⁸ Blood samples were collected from Chagas disease chronic patients confirmed by serological tests (FT, CFT, HA). After removal of plasma, the parasite cells were washed with LIT medium and centrifuged at 2,000g for 15 minutes. The supernatant was discarded, and the pellet was divided into 6 sterile screw-capped tubes 18x200 containing 6 mL of

3. Ministerio da Saude. Secretaria de Vigilancia em, S. "[Brazilian Consensus on Chagas disease]." *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2005**, *38*, Suppl. 3, 7-29

4. Andrews, N. W.; Colli, W. *J Protozool.* **1982**, *29*, 264.

5. Camargo, M. E. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **1966**, *8*, 227.

6. Almeida, I. C.; Covas, D. T.; Soussumi, L. M.; Travassos, L. R. *Transfusion* **1997**, *37*, 850.

7. Almeida, I. C.; Camargo, M. M.; Procopio, D. O.; Silva, L. S.; Mehlert, A.; Travassos, L. R.; Gazzinelli, R. T.; Ferguson, M. A. *EMBO J* **2000**, *19*, 1476.

8. (a) Avila, H.; Goncalves, A. M.; Nehme, N. S.; Morel, C. M.; Simpson, L. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1990**, *42*, 175. (b) Gomes, M. L.; Macedo, A. M.; Vago, A. R.; Pena, S. D.; Galvao, L. M.; Chiari, E. *Exp. Parasitol.* **1998**, *88*, 28.

LIT medium and incubated at 28°C. The tubes were agitated for two days to homogenate the culture, and the samples were tested for parasites 60 days later.⁹

Serological assays

All the samples were screened by the standard EpEx (Complex Epimastigote Antigen of *T. cruzi*) and tGPI-mucin antigen detection kits, as described previously.^{3,10} ELISA assays using our reagents were performed as previously described, with minor adjustments. Briefly, Q β (α -Gal)₅₄₀ particles (50 μ L, at 10 μ g/mL) in 50 mM carbonate-bicarbonate buffer pH 9.5 were immobilized onto 96-well ELISA microplate wells (Nunc). After overnight incubation at 4 °C, free microplate binding sites were blocked with 2% bovine serum albumin (BSA, Sigma Aldrich) in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4. The plates were incubated with 50 μ L human sera, at 1:800 dilution in PBS containing 2% BSA (PBS-BSA). Plates were then sequentially incubated with 50 μ L with biotinylated anti-human IgG (1:2500 dilution) (Amersham, GE Healthcare Life Sciences, UK) in PBS-BSA, and 50 μ L streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (1:4000 dilution) (Amersham) in PBS-BSA. All incubation steps were performed at 37 °C for 1 h. Plates were washed five times with PBS containing 0.05% Tween 20 after each incubation period. The reaction was developed with 100 μ L of peroxidase substrate SigmaFast™ OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride and urea hydrogen peroxide, Sigma-Aldrich) and the reaction stopped by addition of 2N sulfuric acid. Absorbance measurements were performed in a Multiskan GO instrument, using SkanIt 3.2 software (Thermo Scientific). We included in each plate a positive control (pool of 20 sera of confirmed chronic CD patients), a negative control (pool of 20 healthy donor sera from Chagas endemic areas), and a background control (the incubation buffer with no sera added), which were assayed in triplicate. In addition, Q β -glucose particles were used as a negative control reagent, giving no detectable signal above background even for positive control serum samples.

Data analysis

All samples were analyzed in triplicate and evaluated at least twice for all experiments. For in-house ELISA tests, the cut-off was defined as the mean OD of negative serum samples (n = 45) plus three standard deviations. Statistical analysis was conducted using GraphPad Prism 5 software. Sensitivity and specificity to Q β - α -Gal antigen were calculated as based on conventional serology criteria; Specificity (S=TN/TN+FP) and Sensitivity (Se= TP/TP+FN). For individual tests, sera were normalized by the equation: $a + (x-A)*(b-a)/B-A$, where A= minimal value obtained; B = maximum value obtained; a = 1 and b=9. Seropositivity rates for anti-*T. cruzi* antibodies in different tests, and their confidence intervals [CIs], were calculated using the mid-P 95% confidence interval (95% CI) using Rock curve from Prism 5 software.

9. Chiari, E.; Dias, J. C.; Lana, M.; Chiari, C. A. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **1989**, *22*, 19.

10. (a) De Marchi, C. R.; Di Noia, J. M.; Frasc, A. C.; Amato Neto, V.; Almeida, I. C.; Buscaglia, C. A. *Clin.*

Vaccine Immunol. **2011**, *18*, 1850. (b) Izquierdo, L.; Marques, A. F.; Gallego, M.; Sanz, S.; Tebar, S.; Riera, C.; Quinto, L.; Aldasoro, E.; Almeida, I. C.; Gascon, J. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2013**, *108*, 928.

MOA lectin analysis

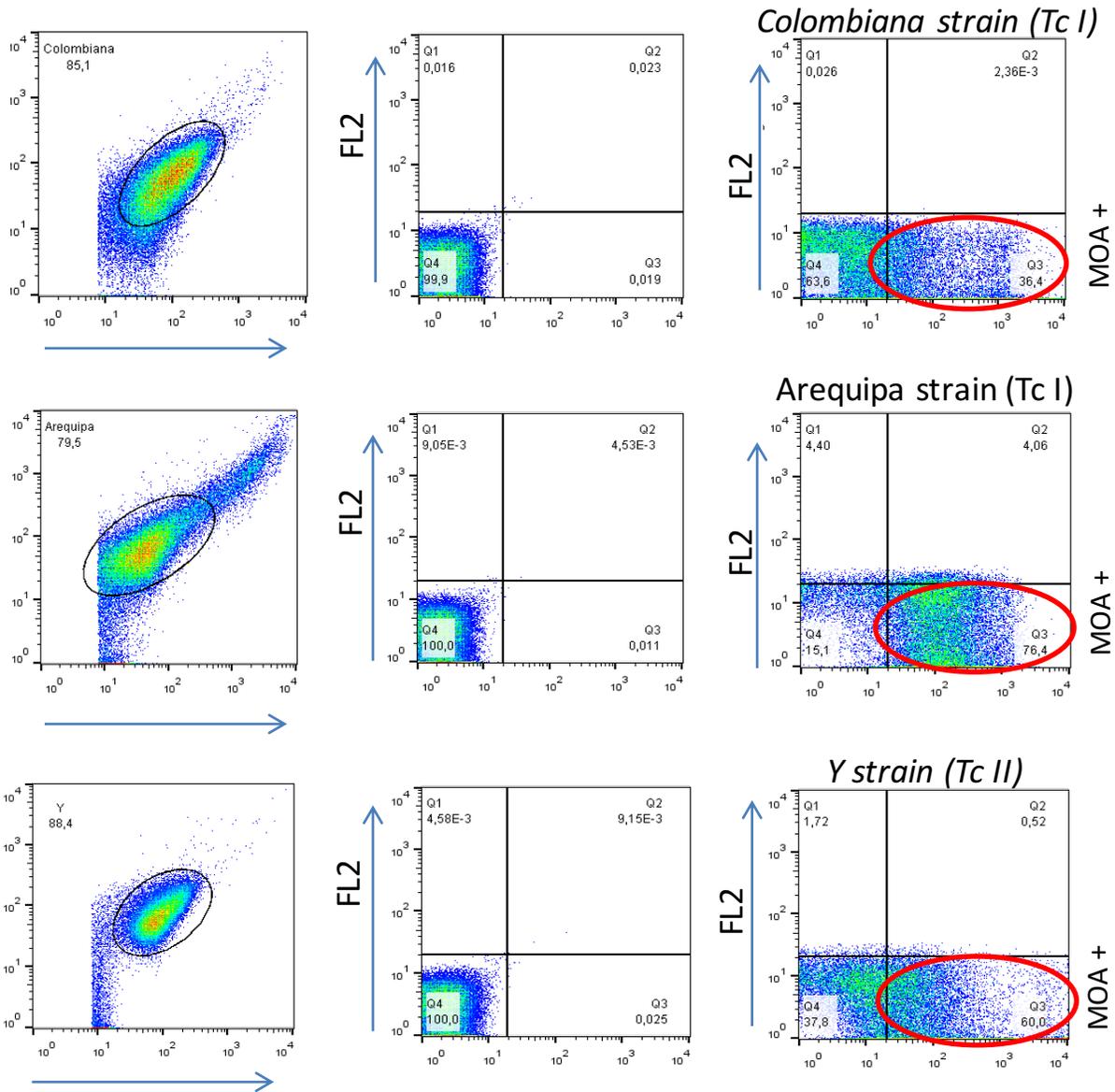


Figure S1. Trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* were centrifuged at 2000 x g for 10 min at 4 °C, washed 3X with PBS and resuspended in 2% paraformaldehyde in PBS. Parasites were washed twice with 1X PBS and the cells were blocked with 5% fetal bovine serum in PBS for 20 minutes at room temperature. Then, cells were incubated with the FITC-lectin MOA (Marasmius orades lectin, MOA) at a dilution of 1: 50 for 20 minutes at room temperature. After washing, cells were resuspended in 150 μ L of PBS. Data were collected on FACScan flow cytometer (Becton Dickinson). The experiment was performed in duplicate and 50,000 events were acquired for each sample for quantitative analysis. Data were analyzed in FlowJo X.0.7 software (Tree Star Inc.).

Synthetic Procedures

α -Gal trisaccharide and glucosyl derivatives. The functional trisaccharide and negative control alkynes were synthesized by the steps shown in Figures S1-S5, following the procedures described in:

Plaza-Alexander, P.; Lowary, T., *ARKIVOC*, **2013**, 2, 112-122.

Codee, J.D.C.; Van den Bos, L.J.; Litjens, R.E.J.N.; Overkleeft, H.S.; Van Boom, J.H.; Van der Marel, G.A. *Org. Lett.*, **2003**, 5, 1947-1950 (doi: 10.1021/ol034528v)

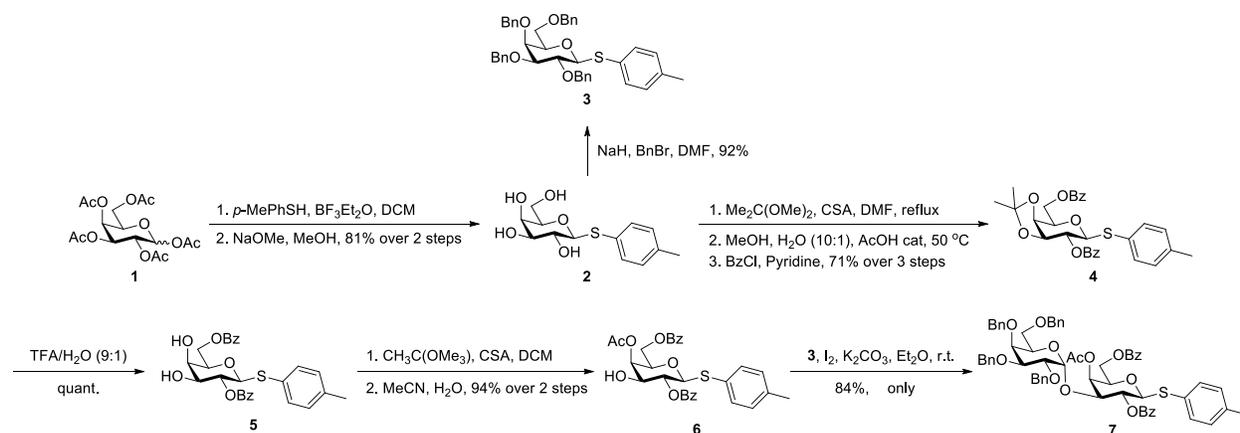


Figure S2. Synthesis of α Gal disaccharide.

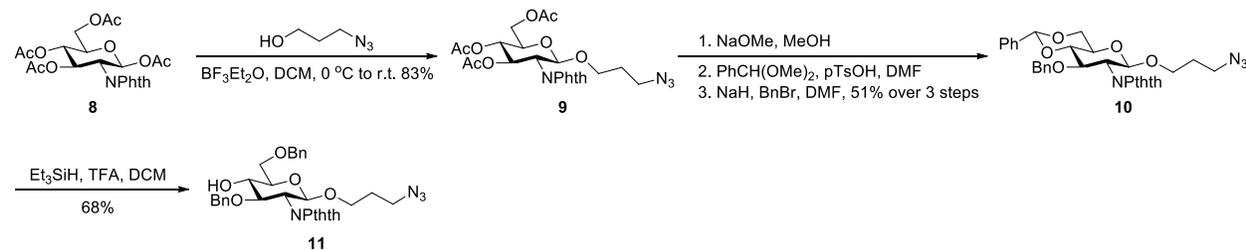


Figure S3. Synthesis of GlcNAc acceptor.

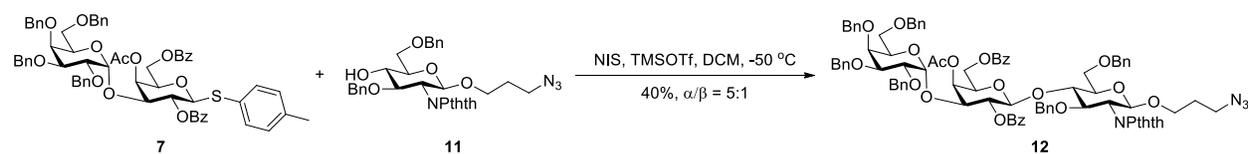


Figure S4. α -Gal assembly.

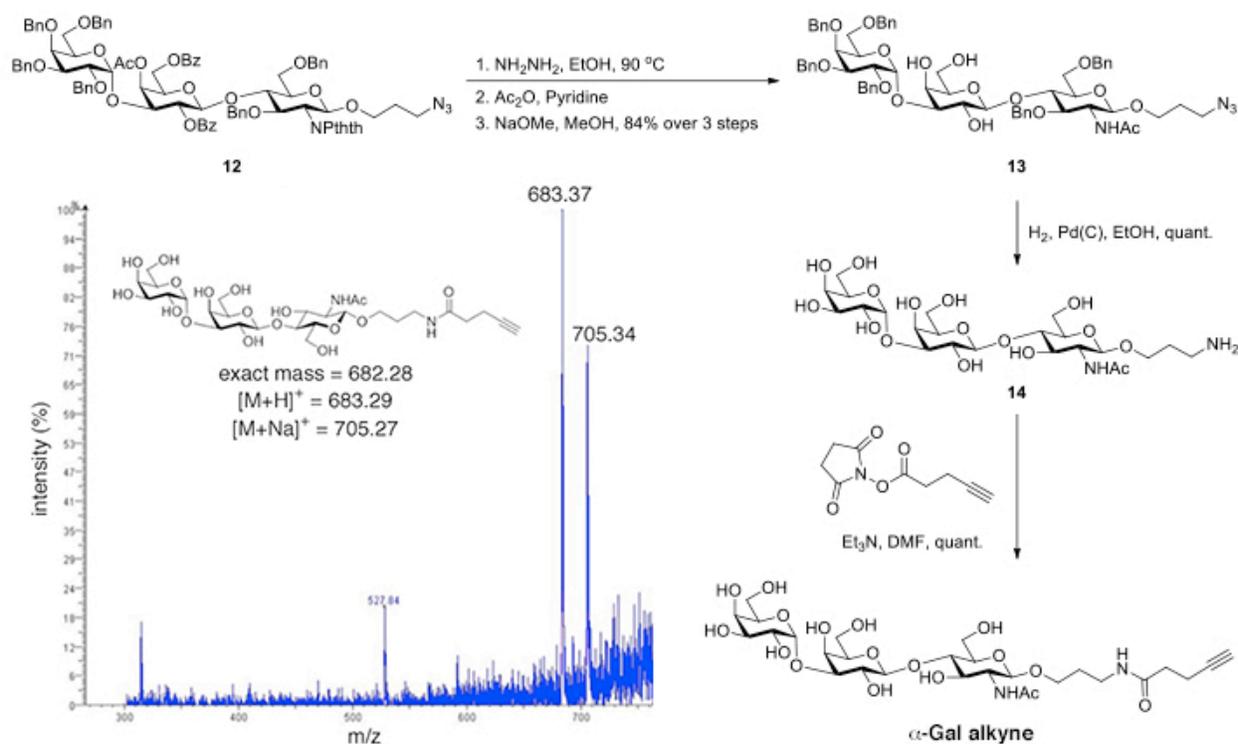


Figure S5. Final steps, and electrospray ionization mass spectrum of the final product (inset).

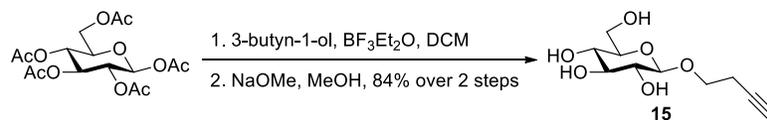


Figure S6. Glucose alkyne for negative control.

Functionalized Q β -virus like particles

Q β virus-like particles were prepared and purified as described previously.¹¹ The functional and negative-control sugars were attached to the exterior surface of the Q β virus-like particle by the manipulations shown in Figure 1, and described in detail below. Analytical data are shown in Figures S7 and S8.

Briefly, the surface amino groups of the Q β capsid, mostly on the exterior of the particle, were first acylated with an N-hydroxysuccinimide ester bearing an azide group at the end of a short tether¹² (Figure 1 of the main paper). α -Gal trisaccharide (α -Gal-OH, both obtained commercially from Carbosynth US, San Diego, CA, and synthesized in house, see below) and glucose were converted their respective alkyne derivatives. The polyvalent azide particles were then efficiently addressed with the carbohydrate-alkynes (α -Gal or glucosyl as negative control) by copper-catalyzed azide-alkyne

11. Fiedler, J. D.; Brown, S. D.; Lau, J. L.; Finn, M. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9648.

12. Banerjee, D.; Liu, A. P.; Voss, N. R.; Schmid, S. L.; Finn, M. G. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1273.

cycloaddition.¹³ After purification via sucrose gradient ultracentrifugation, the particles were characterized by size-exclusion chromatography, dynamic light scattering (Wyatt DynaPro), microfluidic gel electrophoresis (Agilent Bioanalyzer 2100, using Protein 80 chips), and high resolution electrospray ionization mass spectrometry (Agilent G6230B); representative samples were further examined by transmission electron microscopy and multi-angle light scattering (Malvern Viscotec). In all cases, standard properties of size and composition were observed, with the particles showing narrow size distributions and high protein purity (less than 5% protein impurities detected). Protein concentrations in solution were measured with the Coomassie Plus Protein Reagent (Pierce), standardized with bovine serum albumin.

Q β -(azide)_{700±20}: A solution of NHS-azide¹⁴ (52.6 mg, 169 μ mol) was dissolved in DMSO (0.84 mL) and was added dropwise to an ice bath cooled solution of Q β -WT (30 mg, 3.33 mL from a 9.0 mg/mL solution in 0.1 M potassium phosphate buffer, 2.1 μ mol subunit, 8.45 μ mol reactive amine). The reaction tube was affixed to a slow rotisserie device for gentle agitation at 4 °C for 10 h. After this time, the azide modified VLPs were purified by ultracentrifugation through a 10-40% sucrose gradient at 28k rpm for 4 h at 4 °C (SW28 rotor). The band corresponding to intact particles was pulled from the gradient and ultra-pelleted at 68k rpm for at least 2 h at 4 °C (Ti 70.1 rotor). The colorless protein pellet was re-suspended in potassium phosphate buffer (2.0 mL), and sterile filtered through a 0.2 μ m PTFE filter. The protein content was quantified by Bradford assay against BSA standards, showing a percent recovery of intact particles of approximately 54%. Analytical size-exclusion FPLC (Superose-6 column) showed the acylated protein to be composed of >95% intact particles. The extent of acylation was determined by MALDI MS.

Q β -(gal)_{540±40}: To a solution of Q β -(azide)_{700±20} (5 mg, 0.714 mL from a 7.0 mg/mL stock solution in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.0, 0.34 μ mol subunit, 1.3 μ mol reactive azide) was sequentially added alkyne modified α -Gal (270 μ L from a 10 mM stock solution in DMSO, 2.7 μ mol), THPTA¹⁵ (130 μ L from a 50 mM stock solution in H₂O, 6.5 μ mol), CuSO₄ (26 μ L from a 50 mM stock solution in H₂O, 1.3 μ mol), amino guanidine (130 μ L from a 100 mM stock solution in H₂O, 13 μ mol) and finally freshly prepared (+)-sodium ascorbate (130 μ L from a 100 mM stock solution in H₂O, 13 μ mol). The reaction was gently inverted several times to ensure mixing of reagents, then was incubated at 37 °C for 10 h. Upon completion, the product was purified centrifugal filtration using an Amicon Ultra 100 kDa MW cut-off device against 0.1 M potassium phosphate buffer, and was sterile filtered through a 0.2 μ m PTFE filter. The protein content was quantified by Bradford assay against BSA standards, showing a percent recovery of intact particles of approximately 85%. Analytical size-exclusion FPLC (Superose-6 column) showed the acylated protein to be composed of >95% intact particles. The extent of acylation was determined by MALDI MS.

Q β -(Glc)_{540±40}: A solution of Q β -(azide)_{700±20} (2 mg, 0.23 mL from a 8.8 mg/mL stock solution in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.0, 0.134 μ mol subunit, 0.54 μ mol reactive azide) was sequentially added alkyne modified glucose (108 μ L from a 10 mM stock solution in DMSO, 1.08 μ mol), THPTA (54

13. Hong, V.; Presolski, S. I.; Ma, C.; Finn, M. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9879.

14. Sen Gupta, S.; Raja, K.S.; Kaltgrad, E.; Strable, E.; Finn, M.G. *Chem. Commun.* **2005**, 4315.

15. Kislukhin, A.; Hong, V.; Breitenkamp, K.; Finn, M.G. *Bioconj. Chem.* **2013**, 684.

μL from a 50 mM stock solution in H_2O , 2.7 μmol), CuSO_4 (10.8 μL from a 50 mM stock solution in H_2O , .54 μmol), amino guanidine (108 μL from a 100 mM stock solution in H_2O , 10.8 μmol) and finally freshly prepared (+)-sodium ascorbate (108 μL from a 100 mM stock solution in H_2O , 10.8 μmol). The reaction was gently inverted several times to ensure mixing of reagents, then was incubated at 37 °C for 10 h. Upon completion, the product was purified centrifugal filtration using an Amicon Ultra 100 kDa MW cut-off device against 0.1 M potassium phosphate buffer, and was sterile filtered through a 0.2 μm PTFE filter. The protein content was quantified by Bradford assay against BSA standards, showing a percent recovery of intact particles of approximately 85%. Analytical size-exclusion FPLC (Superose-6 column) showed the acylated protein to be composed of >95% intact particles. The extent of acylation was determined by MALDI MS.

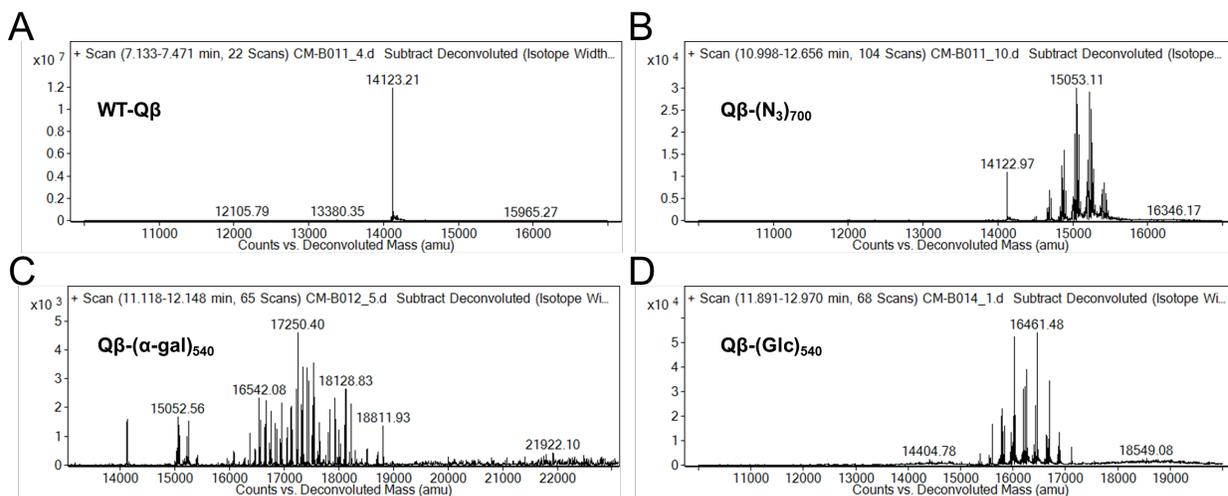


Figure S7. HRMS (ESI-TOF) analysis of WT-Q β , Q β -(N₃)₇₀₀, Q β -(α -gal)₅₄₀ and Q β -(glc)₅₄₀.

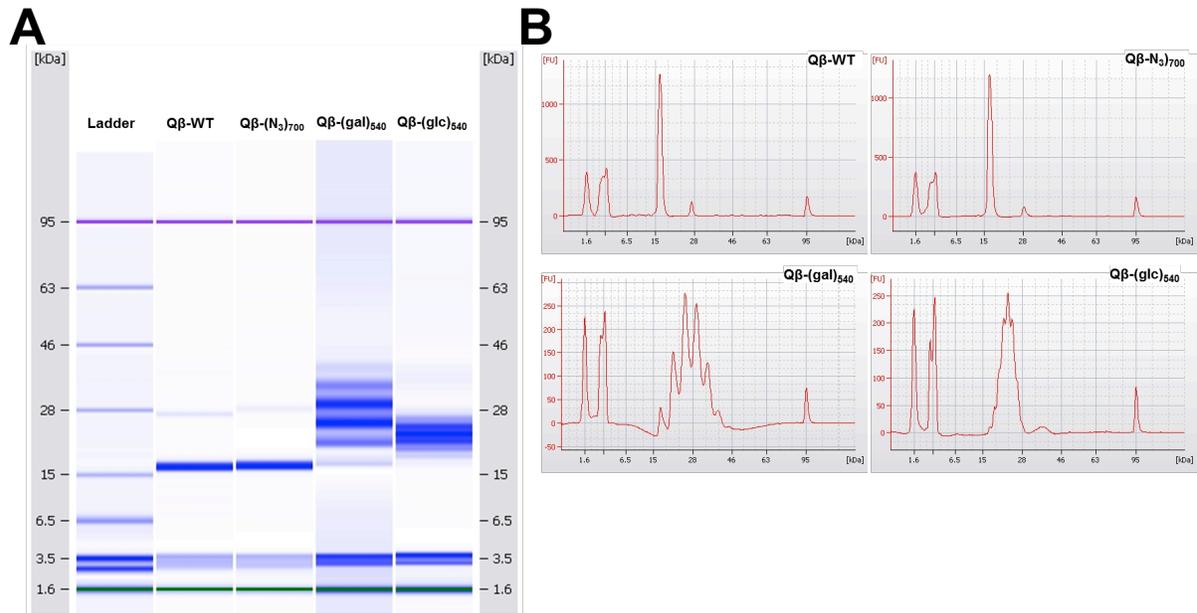


Figure S8. Electrophoretic analysis of Qβ GM2 conjugate. (A) gel results and (B) electropherogram.