

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**ESTUDO DE GLICÍDIOS DE *Angiostrongylus*  
*cantonensis* E O PAPEL NO  
IMUNODIAGNÓSTICO**

**CAROLINA DE MARCO VERÍSSIMO**

Tese de Doutorado apresentada como um dos pré-requisitos para obtenção do grau de Doutora em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Graeff Teixeira

Co-orientada: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Alessandra L. Morassutti

PORTO ALEGRE

2015

## FICHA CATALOGRÁFICA

# TERMO DE APRESENTAÇÃO

“Stay faithful to my dreams. Listen to my heart as much as my brain, fight against laziness, conformism, mediocrity (start with my own) and look for quality in everything. Show respect to others”. (Cristophe Lemaire)

## AGRADECIMENTOS

Em 2008, quando eu ainda estava na graduação, o prof. Carlos Graeff-Teixeira respondeu meu email e me deu a oportunidade de participar do Grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS. Ele permitiu que eu descobrisse o mundo da parasitologia! Durante os anos seguintes, além de ter me apaixonado por parasito, também aprendi sobre vida e sobre pesquisa em diversos níveis. Ter o prof. Carlos como orientador me fez crescer como pesquisadora e pessoa. A isso serei eternamente grata. Obrigada por tudo professor Carlos!

Essa tese é o resultado de um trabalho em equipe! Assim, aqui preciso destacar o papel da prof. Alessandra Loureiro Morassutti, que foi minha orientadora, amiga e estimuladora! Em especial, agradeço pela confiança no momento que decidimos que eu iria trabalhar nesse projeto de pesquisa, que é algo que ela gosta muito e teve início anos atrás no doutorado dela! Além disso, eu não sei contar o quanto eu aprendi sobre pesquisa, biologia molecular, parasito, comportamento, vida e tantas outras coisas com ela. Mas mais importante do que isso tudo, foi trabalhar durante esses anos mais com uma amiga do que com uma orientadora. Ter tido a liberdade de conversar e trocar ideias. Ale, mil vezes obrigada por tudo isso e por me apoiar tanto!!! Eu sei que ainda vamos trabalhar muito juntas!

Ainda sobre o trabalho em equipe, algumas pessoas foram fundamentais pelo apoio incondicional e amizades. A dona Renata Russo (Rê) é uma dessas pessoas com uma alma singular, humilde, honesta, aberta, cheia de conhecimento e de brilho. E o mais importante, ela é generosa! Quanta sorte eu tenho!! Obrigada, Rê, por acreditar tanto em mim, por tua amizade e simplicidade, que são revigorantes! Obrigada por me ensinar muito sobre vida e amizades, por me ajudar no inglês sempre e sempre, e por discutir ciência comigo (literalmente!).

E porque uma pessoa não pode nada sozinha, muito menos ser feliz, eu agradeço aos meus amigos que estiveram presentes em todos os momentos, longe

ou perto, e me fazem uma pessoa mais leve por permitirem desabafos e por me encherem de conselhos, amor e apoio. Em especial: Thalita, Lua Panatieri, Ana Maris Carlesso, Ismael P. Sauter, Mari Aline Wink, Roberta Reis, Vívian Favero, João Luiz, Day Otta, Jéssica G. Kjak, Carla Karusky, Lílian Tumelero, Rosinha e Márcia Cristina. Aos amigos e colegas da Parasito-PUCRS: Joana, Vívi, Bianca, Vanessa Fey. Vocês sabem como fazer o dia-a-dia do lab melhor! A minha “Aussie family” que durante um ano foram meu porto seguro: Jennifer Reiman, Juliane Mayr, Juliana Yeung, Cindy, Sai De Lata e Júlia Bezerra. Thank you very much girls, I’m glad to have you as my friends!

Família, família!! Eles acreditam mais em mim do que eu mesma!! Obrigada especialmente pela criação e educação que recebi dos meus pais, Maria Alice e Ênio Humberto, bem como pelo amor e apoio em todas as horas. Meus pais também me deram as pessoas mais especiais da minha vida, que são os meus irmãos: Humberto, Alexandre, Felipe e Camila. Eles são meus melhores e mais fiéis amigos, que me apoiam e me dão suporte em absolutamente tudo, além de terem colocado no meu caminho a Priscila, a Thalita e a Maria Eduarda. Pessoal, eu amo vocês de um jeito inexplicável, e sou quem sou e cheguei até aqui graças a vocês!

Por fim, agradeço à Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, ao CNPq – Brasil e a todas as pessoas envolvidas nas análises desse trabalho, que foram realizadas nos seguintes locais: Laboratório de Parasitologia Molecular da PUCRS – Brasil; Institute for Glycomics – Griffith University, Gold Coast – Australia; QIMR Berghofer Medical Research Institute, Brisbane – Australia; Faculty of Science and Engineering, Macquarie University, Sydney – Australia; and Department of Biological Science, Imperial College London, UK.

# ESTUDO DE GLICÍDIOS DE *Angiostrongylus cantonensis* E O PAPEL NO IMUNODIAGNÓSTICO

## RESUMO

*Angiostrongylus cantonensis* é um nematódeo parasita, principal agente etiológico da meningite eosinofílica (ME) em humanos, doença endêmica em diversos países tropicais e subtropicais. A ME se caracteriza pela eosinofilia >10% no líquido, e histórico de ingestão de moluscos crus, já que estes são hospedeiros intermediários do *Angiostrongylus*. O diagnóstico definitivo é raramente possível através da visualização da larva no líquido. Testes sorológicos envolvendo principalmente a detecção do componente de 31-kDa, que apresenta alta sensibilidade e especificidade, tem sido empregados como uma alternativa diagnóstica. O antígeno de 31-kDa é composto por glicoproteínas e tentativas em produzi-lo de maneira recombinante, em modelos procarióticos ou eucarióticos, não tiveram sucesso em manter o reconhecimento imunológico, provavelmente pela incorreta ou insuficiente glicosilação das moléculas. Devido à falta de informação sobre glicídios de *A. cantonensis* e a necessidade de produzir um antígeno padrão capaz de ser usado em um teste de diagnóstico para distribuição mundial, o objetivo principal deste trabalho foi estudar o perfil glicídico de *A. cantonensis* e o papel dessas moléculas no imunodiagnóstico da ME. Foram utilizados extratos solúveis totais (ET) de vermes adultos machos e fêmeas e produtos de excreção e secreção (ES) como fontes dos glicídios e glicoconjugados estudados. Os *N*-glicídios e glicoconjugados do ET de verme fêmea de *A. cantonensis* e o antígeno de 31-kDa foram analisados e identificados por espectrometria de massa (EM) e lectina array, e a importância imunogênica destas moléculas foi caracterizada por tratamento com glicosidases aliado a dot blot ou Western blot. Além disso, foi investigada a presença de enzimas envolvidas na síntese de diferentes glicídios a partir de análises *in silico* do genoma e transcriptoma do *Angiostrongylus*. Diversos *N*-glicídios foram identificados nas amostras analisadas. Estes continham estruturas complexas, com antenas truncadas contendo galactose e *N*-acetilgalactosamina em posições terminais e núcleo  $\alpha_{1-6}$  fucosilado. As mesmas estruturas terminais foram identificadas pela análise de *Lectin Array*. Em relação a análise *in silico* da biossíntese de glicídios em *Angiostrongylus*, foram identificados oito genes envolvidos na síntese de *N*-glicídios, entre eles GCS1; GANAB, MAN1, MGAT2 e FUT8; e pelo menos três genes envolvidos na síntese de *O*-glicídios, GALNT, C1GALT1 e OFUT1. Os *N*-glicídios se mostraram essenciais para a imunogenicidade do antígeno de 31-kDa quando soros positivos para *A. cantonensis* foram testados. Uma modelagem *in silico* dos componentes de 31-kDa, demonstrou sítios de glicosilação para *N*-glicídios, e previu as mesmas estruturas que foram identificadas por EM. Em conjunto, os dados

gerados neste estudo mostraram a importância de glicídios para o diagnóstico de angiostrongilíases e também o repertório de glicídios que este parasito pode produzir. Este trabalho é uma contribuição importante para o desenvolvimento de um diagnóstico padrão para a ME e também para novas perspectivas no estudo do diagnóstico de angiostrongilíases, biologia do parasito e relação parasito-hospedeiro.

**Palavras Chave:** *Angiostrongylus cantonensis*, Glicídios, Imunodiagnóstico, Angiostrongylíase, Análise de glicídios.



# GLYCAN STUDY OF THE *Angiostrongylus cantonensis* AND THEIR ROLE ON THE IMMUNODIAGNOSIS

## ABSTRACT

*Angiostrongylus cantonensis* is a nematode parasite, main etiologic agent of the eosinophilic meningitis (EM) in humans, a disease endemic in many tropical and sub tropical countries. The diagnosis of EM involves clinical evaluation, eosinophils counting >10% in liquor, and consuming historical of raw mollusks, as they are the intermediate hosts of the *Angiostrongylus*. Definitive diagnosis through larvae visualization in the liquor is rare. Serological test, mainly involving the 31-kDa component detection, which presents high sensitivity and specificity, has been employed as an alternative way for diagnostic. The 31-kDa antigen is composed for glycoproteins and tentatives in producing it in a recombinant way, using either prokaryotic or eukaryotic models, were unable to maintain immunological recognition, probably due the lack or deficient glycosilation of the molecules. Due the lack of information about *A. cantonensis* glycans and the need of producing a standard antigen able to be used worldwide in a diagnostic test, the main goal of this work was to study the *A. cantonensis* glycan profile and their role on the immune diagnosis of EM. It was used total soluble extract (TE) and excretory-secretory products (ES) as sources of glycans and glycoconjugates. The *N*-linked glycans and glycoconjugates from *A. cantonensis* female TE and 31-kDa antigen were analyzed and identified by mass spectrometry (MS) and lectin array, and the immunogenecity of these molecules were characterized by dot blot and Western blots. Furthermore, It was investigated the biosynthesis routes of glycans using *in silico* analysis of the *Angiostrongylus* genome and transcriptome dataset. *N*-glycans containing complex structures, with truncated antennas containing terminal with galactose and *N*-acetylgalactosamine, and core  $\alpha_{1-6}$  fucosylated were identified. Lectin array analysis could also identify Gal and GalNAc structures in *Angiostrongylus* glycoconjugates. Eight genes involved with biosynthesis of *N*-glycans, among them GCS1; GANAB, MAN1, MGAT2 and FUT8; and three involved with *O*-glycan biosynthesis, GALNT, C1GALT1 e OFUT1 were found by *in silico* analysis. Immunogenicity of the 31-kDa antigen is tottaly dependent of *N*-glycans and not to *O*-glycans. Modeling of proteins of the 31kDa component showed *N*-glycosilation sites and predicted structures that were the same identified by MS analysis. Taking together, the data generated in this study shown the glycan importance for angiostrongyliasis diagnosis and also the glycan repertoire that *Angiostrongylus* produces. This work is an important contribution to the development of a standard diagnosis for EM and also for new

perspectives in the study of angiostrongyliasis diagnosis, parasite biology and host-parasite relationship.

**Keywords:** *Angiostrongylus cantonensis*, Glycans, Immunodiagnosis, Angiostrongyliasis, Glycans analysis.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Fotomicrografia de verme fêmea adulto de *Angyostrongylus* spp. (fonte: Laboratório de Parasitologia da PUCRS).....17
- Figura 2** - Representação do ciclo de vida do *A. cantonensis* e *A. costaricensis*, espécies de importância médica para o homem. Fonte: CDC/USA – <http://www.dpd.cdc.dpdx> .....19
- Figura 3** - Mapa da ocorrência de angiostrongilíase abdominal no Mundo (modificado de Wang *et al.*, 2008) .....21
- Figura 4** - Distribuição geográfica de hospedeiros intermediários, definitivos e casos humanos positivos para *A. cantonensis* no Brasil (Fonte: Morassutti *et al.*, 2014)....22
- Figura 5** - Algoritmo para o diagnóstico da angiostrongilíase cerebral, idealizado por Morassutti e colaboradores (2014) .....28
- Figura 6** - Estrutura dos açúcares nas suas formas mais simples .....31
- Figura 7** - Exemplos da estrutura de N- e O-Glicoproteínas (Adaptado de: Ito & Matsuo, 2003) .....35
- Figura 8** - Tipos de Ligações O- e N-glicosídicas já descritas (Adaptado de Spiro, 2002) .....36
- Figura 10** - Estrutura de um glicídio com alto conteúdo de manose. ● = Manose; ■ = GlcNAc. (Adaptado de Haslam *et al.*, 2001) .....37
- Figura 11** - Estrutura de um glicídio truncado. ● = Manose; ■ = GlcNAc. (Adaptado de Haslam *et al.*, 2001) .....38
- Figura 12** - Representação esquemática da estrutura de glicídios complexos. A) glicídio complexo imaturo; B) Estruturas diferentes que podem ocorrer nas antenas de glicídios complexos de mamíferos e as capas frequentemente adicionadas; C) Estruturas diferentes que podem ocorrer nas antenas de glicídios complexos de parasitos e as capas frequentemente adicionadas. ● = Manose; ■ = GlcNAc; ● = Gal; ■ = GalNAc; ■ = HexNAc; ▲ = Fucose; ◆ = NeuAc. (Adaptado de Haslam *et al.*, 2001) .....38
- Figura 13** - Estrutura de glicídio híbrido. ● = Manose; ■ = GlcNAc; ▲ = Fucose. (Adaptado de Haslam *et al.*, 2001) .....40

**Figura 14** - Esquema de biossíntese de O-glicoproteínas. 1: Adição do glicídio precursor GalNAc pela enzima ppGaNTase; 2: Exemplo de extensões do esqueleto de O-glicídios; 3: exemplo de alongamento e capas que podem ocorrer em O-glicídios (Adaptado de: Corfield, 2014) .....41

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Principais trabalhos buscando alternativas para o diagnóstico da angiostrongilíase cerebral .....	24
<b>Tabela 2</b> - Tipo de açúcares que predominam em glicoconjugados presentes em humanos .....	32
<b>Tabela 3</b> - Receptores Tipo Lectina-C encontrados em células de defesa humanas .....	45
<b>Tabela 4</b> - Principais glicídios já descritos em parasitos helmintos e protozoários .....	48
<b>Tabela 5</b> - Principais métodos aplicados para análise de glicídios e glicoconjugados. (Adaptado de: Solis <i>et al.</i> , 2015) .....	54

## LISTA DE SIGLAS

AC – Angiostrongilíase cerebral

Asn - Asparagina

ASO - Antígeno solúvel de ovos de *Schistosoma*

CCA - Antígeno catódico contendo ácido glucurônico

CD – Célula dendrítica

CDC – do inglês, *Center for Disease Control and Prevention*

CG – Complexo de Golgi

CRL – Receptores tipo Lectina-C

ELISA – do inglês, *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*

ES – Antígeno de excreção e secreção

ET – Antígeno solúvel total

Fuc- Fucose

Gal - Galactose

GalNAc – *N*-acetilgalactosamina

GlcNAc – *N*-acetilglucosamina

GPI – Glicosilfosfatidilinositol

Hex - Hexose

IgA – Imunoglobulina A

IgE - Imunoglobulina E

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

ITS - Espaço interno transcrito do DNA ribossomal

LacdiNAc / LDN – *N*-diacetillactosamina

LacNAc / LN - *N*-acetyl-lactosamina

LDN-diF – LDN di-fucosilado

Le<sup>X</sup> – Glicídio Lewis X

LPG – Lipofosfoglicanos

LPPG - Lipopeptídeofosfoglicano

Man – Manose

ME – Meningite eosinofílica

NeuAc – Ácido *N*-acetilneuroamínico (Ácido siálico)

ON – Óxido nítrico

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PPG - Proteofosfoglicano

RE – Retículo endoplasmático

Ser - Serina

Thr - Treonina

Th2 – *T-helper2*

TLR – Receptores *Toll-like*

TNF $\alpha$  – Fator de necrose tumoral

TSL-1 - Antígeno 1 de *T. spiralis*

Tyv - Tivelose

VSG - Glicoproteína variante de superfície

WB – Western Blot

# SUMÁRIO

<b>1 CAPÍTULO 1</b> .....	<b>17</b>
<b>1.1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1.1 <i>Angiostrongylus cantonensis</i> .....	17
1.1.1.1 Parasito .....	17
1.1.1.2 Angiostrongilíase cerebral .....	19
1.1.1.3 Distribuição Geográfica .....	21
1.1.1.4 Diagnóstico da angiostrongilíase cerebral .....	23
1.1.1.5 Busca de um diagnóstico padrão para a angiostrongilíase .....	28
1.1.2 <i>Glicídios e Glicoconjugados</i> .....	30
1.1.2.1 Biossíntese de N-Glicoproteínas em vertebrados e invertebrados .....	36
1.1.2.2 Biossíntese de O-Glicoproteínas em vertebrados e invertebrados .....	40
1.1.3 <i>O papel de glicoconjugados em parasitos</i> .....	42
1.1.3.1 Glicoconjugados descritos em protozoários .....	56
1.1.3.2 Glicoconjugados descritos em helmintos .....	58
<b>1.2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>65</b>
<b>1.3 OBJETIVO</b> .....	<b>66</b>
1.3.1 <i>Objetivo Geral</i> .....	66
1.3.2 <i>Objetivos Específicos</i> .....	66
<b>2 CAPÍTULO 2</b> .....	<b>67</b>
<b>2.1 ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO: Characterization of the N-glycans of female <i>Angiostrongylus cantonensis</i> worms</b> .....	<b>67</b>
<b>3 CAPÍTULO 3</b> .....	<b>94</b>
<b>3.1 GENERAL DISCUSSION</b> .....	<b>94</b>
<b>3.2 CONCLUSION</b> .....	<b>101</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>102</b>
<b>APPÊNDICES</b> .....	<b>128</b>
<b>APPENDIX A - PAPER IN PREPARATION 1: Characterization of the glycidic portion of the 31-kDa antigen, the major antigen of <i>Angiostrongylus cantonensis</i></b> .....	<b>128</b>
<b>APPENDIX B – PAPER IN PREPARATION 2: Pathological and serological studies on mice and guinea pigs infected with <i>Angiostrongylus mackerrasae</i> as a model for human infection</b> .....	<b>144</b>
<b>APPENDIX C - PAPER IN PREPARATION 3: <i>In silico</i> and biological analysis of glycidic profile and potential glycan biosynthesis pathways of <i>Angiostrongylus cantonensis</i></b> .....	<b>156</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>167</b>
<b>ANEXO A- Parecer do Comitê de Ética de Experimentação Animal – CEUA</b> .....	<b>167</b>



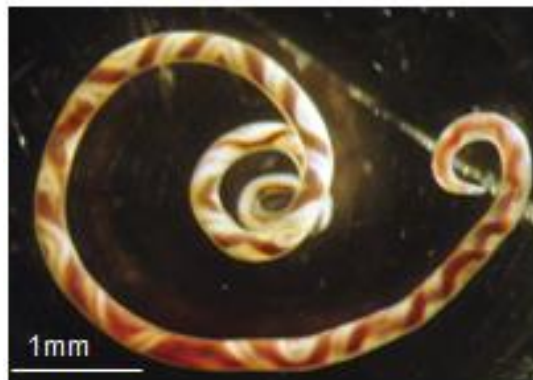
# 1 CAPÍTULO 1

## 1.1 Introdução

### 1.1.1 *Angiostrongylus cantonensis*

#### 1.1.1.1 Parasito

O gênero *Angiostrongylus* Kamensky, 1905, pertence ao filo Nematoda, superfamília Metastrongyloidea, cujos membros são parasitos de sistema respiratório e vascular de mamíferos. Esse gênero reúne 23 espécies de parasitos intra-arteriais de diversos hospedeiros, incluindo roedores, felinos, canídeos e, acidentalmente, primatas (Robles *et al.*, 2008). As espécies de importância médica para o homem incluem *Angiostrongylus cantonensis*, agente etiológico da angiostrongilíase cerebral (AC) ou meningite eosinofílica (ME), e *Angiostrongylus costaricensis*, que causa angiostrongilíase abdominal. Os parasitos deste gênero apresentam dimorfismo sexual, sendo que as fêmeas adultas podem medir entre 22–34 mm x 0.34–0.56 mm, possuem forma helicoidal característica, formada pelo tubo reprodutor, de coloração branca, e o tubo digestivo, avermelhado, que se entrelaçam (Figura 1). Os machos são menores, medindo cerca de 20–25 mm x 0.32–0.42 mm e apresentam somente o tubo digestivo, avermelhado devido a presença de sangue do hospedeiro



**Figura 1.** Fotomicrografia de verme fêmea adulto de *Angiostrongylus* spp. (fonte: Laboratório de Parasitologia da PUCRS)

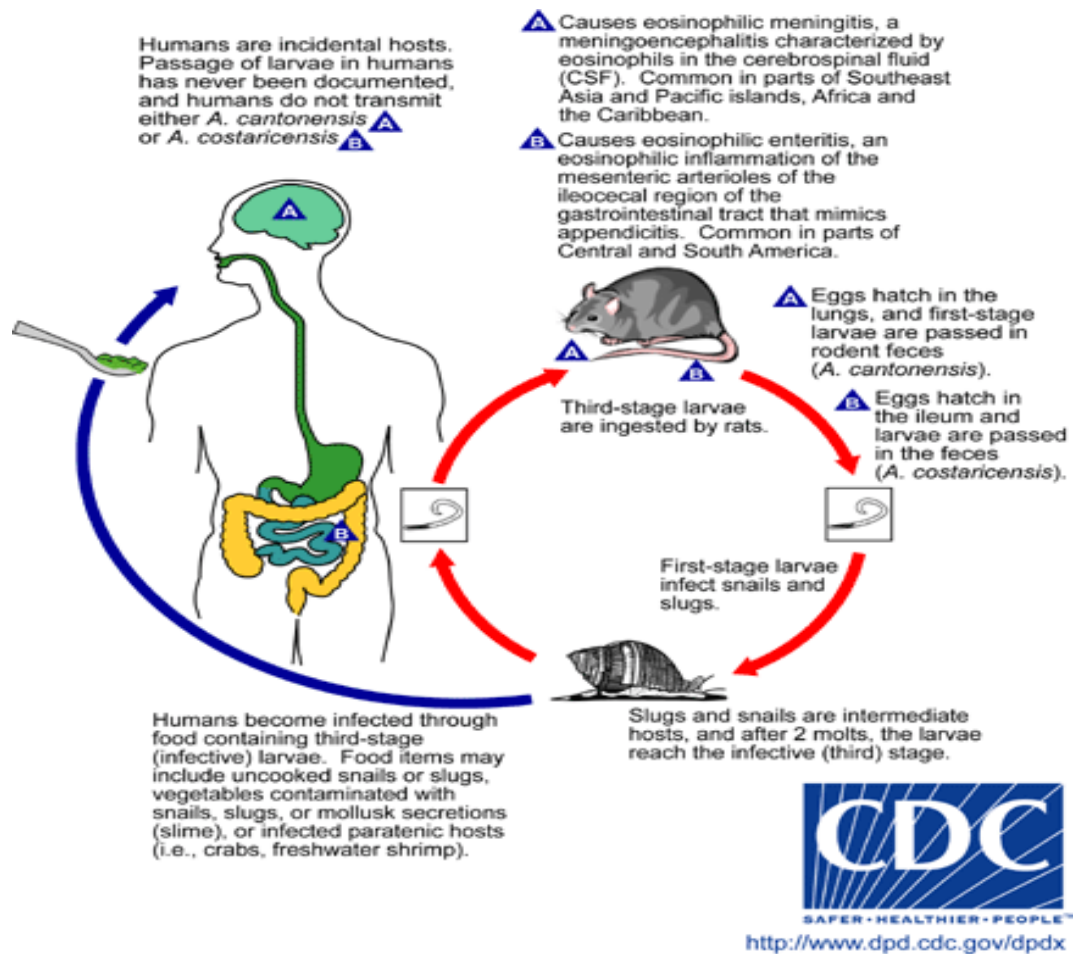
*Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) tem como hospedeiro definitivo natural ratos, onde são encontrados habitando as artérias dos pulmões, sendo o homem hospedeiro acidental (Thiengo *et al.*, 2010). No homem, as larvas podem atravessar os vasos sanguíneos do trato intestinal humano e, eventualmente, atingir as meninges, causando angiostrongilíase cerebral. O *A. cantonensis* foi isolado pela primeira vez em 1944 no líquido cefalorraquidiano (LCR) de um paciente com sintomas de meningite em Taiwan (Nomura & Lin, 1945), e a partir dos anos 60 essa doença foi reconhecida como problema de saúde pública naquele país.

O ciclo de vida de *A. cantonensis* é heteroxênico, cujos hospedeiros definitivos (HD) são roedores, *Rattus rattus* e *Rattus norvegicus*. Gatos, macacos e camundongos podem estar envolvidos na manutenção da parasitose (Slom *et al.*, 2002). Uma variedade de moluscos, tais como *Achatina fulica*, *Bradybaena similaris*, lesmas dos gêneros *Veronicella*, *Limax* e *Deroceras* atuam como hospedeiros intermediários (HI). O caracol exótico *Achatina fulica* pode ser um importante HI deste nematódeo (Malek e Cheng, 1974; Graeff-Teixeira *et al.*, 2009). Outras espécies de moluscos mostraram-se suscetíveis à infecção (Lima *et al.*, 1992). Atualmente, por exemplo, *Biomphalaria glabrata*, pode ser utilizada para a manutenção do ciclo do parasito em laboratório (Ubelaker *et al.*, 1980, Morassutti *et al.*, 2012).

No ciclo de vida do *A. cantonensis*, os roedores eliminam larvas de primeiro estágio (L1) nas fezes que infectam o HI onde evoluem até o terceiro estágio (L3), estágio que são infectivas para os hospedeiros vertebrados. Os HD se infectam por ingestão do próprio molusco infectado ou larvas presentes no ambiente. Depois de ingeridas, as L3 penetram na parede intestinal e migram pela circulação sistêmica. Cerca de três dias depois as larvas atingem o cérebro, onde maturam e atingem o estágio de adultos jovens (L5). Aproximadamente quatro semanas após a penetração das larvas na parede do intestino os vermes migram para a artéria pulmonar onde se reproduzem e liberam ovos que dão origem as L1. Estas larvas penetram na cavidade aérea do pulmão, são deglutidas e eliminadas com as fezes do HD (Wang *et al.*, 2008) (Figura 2).

O homem se infecta ao ingerir moluscos infectados, alimentos crus, água contaminada, ou até pela manipulação de hospedeiros intermediários contaminados

com larvas de terceiro estágio, as quais migram para o sistema nervoso central ocasionando distúrbios neurológicos. Um estudo verificou que 51% dos pacientes haviam se infectado pela ingestão de caramujos (Hwang & Chen, 1991). Outros moluscos e hospedeiros paratênicos, como rãs, camarões de água doce, caranguejos, peixes e planárias, podem ser fonte de infecção (Wang *et al.*, 2008).



**Figura 2.** Representação do ciclo de vida do *A. cantonensis* e *A. costaricensis*, espécies de importância médica para o homem. Fonte: CDC/USA – <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

#### 1.1.1.2 Angiostrongilíase cerebral

Quando infectando humanos, *A. cantonensis* causa angiostrongilíase cerebral ou meningite eosinofílica (Graeff-Teixeira *et al.*, 2009), doença fatal em 3% dos casos (Eamsobhana & Yong 2009). Nesse caso, após atingirem o SNC, as L5 podem mover-se pela medula espinhal onde eventualmente morrem levando a uma reação inflamatória intensa (Pien & Pien, 1999). Os sintomas começam a aparecer

entre três e 30 dias após a ingestão das larvas, ocorrendo principalmente dor de cabeça severa, devido ao aumento da pressão intracraniana causada pela reação inflamatória generalizada nas meninges (Kuberski *et al.*, 1979; Tsai *et al.*, 2001). Este sintoma pode ser aliviado através de repetidas punções lombares (Graeff-Teixeira *et al.*, 2009). Outros sintomas comumente apresentados pelos pacientes incluem rigidez da nuca (64%), febre (37%), náuseas (38%) e vômitos (49%). Sintomas como fraqueza muscular, dor retro-obital, dor abdominal, paralisia facial, convulsões e sonolência são menos comuns (Punyagupta *et al.*, 1975; Kuberski & Wallace 1979; Koo *et al.*, 1988; Graeff-Teixeira *et al.*, 2009; Sawanyawisuth *et al.*, 2009). Além disso, Sawanyawisuth *et al.* (2009), relatou que aproximadamente 6% dos pacientes com angiostrongilíase cerebral apresentam quadro de pneumonia eosinofílica.

A patogenia da infecção por *A. cantonensis* depende diretamente dos danos causados pelo número de larvas, atividade proteolítica e movimentação das larvas e da reação inflamatória granulomatosa, que envolve principalmente eosinófilos. As enzimas e agentes citotóxicos liberados no local pelas larvas e eosinófilos geram lesões e ineficiência vascular, o que pode acarretar em sequelas. O processo inflamatório causa a morte das larvas nas meninges, que pode exacerbar essa resposta (Morassutti *et al.*, 2014).

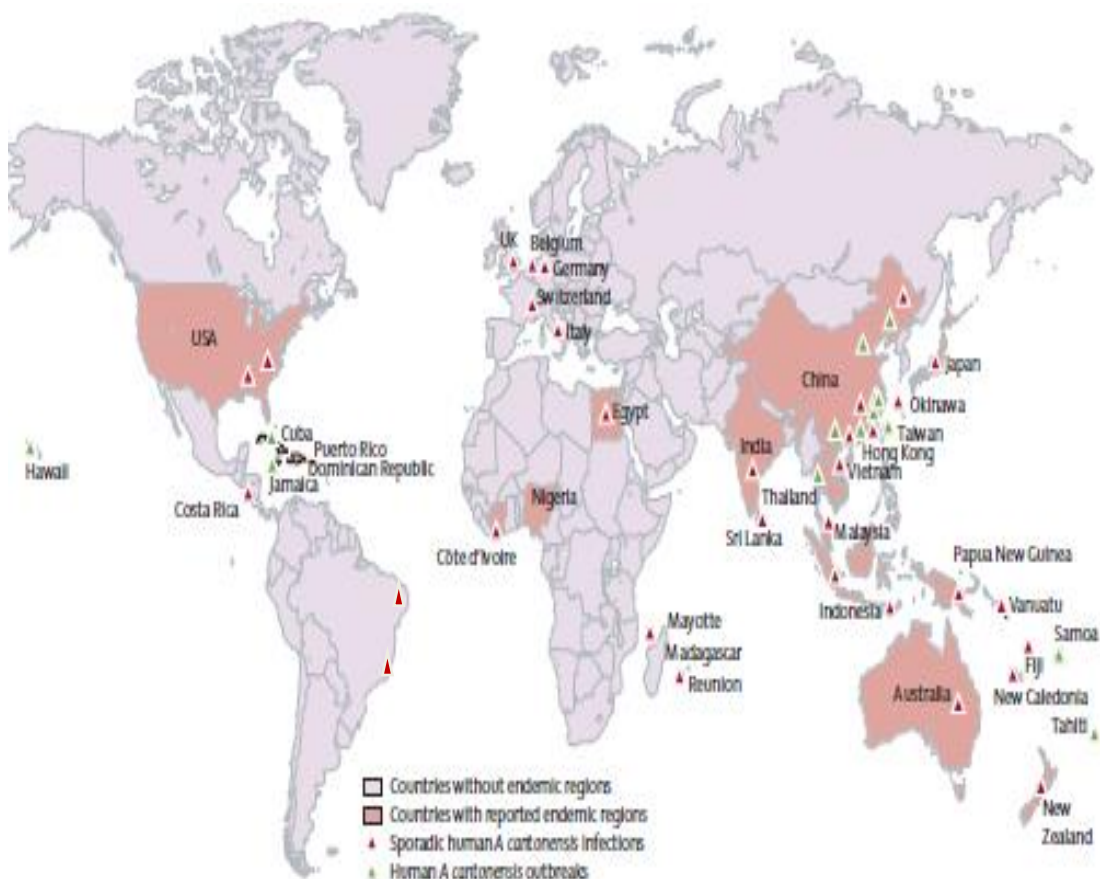
Em casos raros podem ser encontrados vermes adultos nas artérias pulmonares. Um menino de pouco mais de um ano, na Jamaica, faleceu em decorrência de uma meningite. Durante a autópsia foram encontrados diversos vermes tanto no cérebro quanto nas artérias pulmonares, sendo observada a presença de significativo infiltrado eosinofílico no local (Lindo *et al.*, 2004). Outros casos parecidos resultaram na morte de outras duas crianças (Cooke-Yarborough *et al.*, 1999; Morton *et al.*, 2013). Contudo, AC é geralmente uma doença aguda, que cura espontaneamente num prazo de seis a 34 dias e raramente deixa sequelas (Graeff-Teixeira *et al.*, 2009; Tsai *et al.*, 2001).

Com relação ao tratamento, a morte dos vermes de *A. cantonensis* pode levar ao aumento da inflamação, agravando a doença (Wang *et al.*, 2006; Leone *et al.*, 2007). Ainda assim, estudos estão sendo conduzidos em modelos animais e os resultados demonstram que o uso concomitante de anti-helmínticos e

antiinflamatórios pode ser uma boa alternativa para o tratamento (Lai, 2006; Chen & Lai, 2007).

### 1.1.1.3 Distribuição Geográfica

Infecções humanas por *A. cantonensis* já foram descritas na Ásia (Filipinas, Indonésia, Malásia, Tailândia, Vietnã, Taiwan, Hong Kong e Japão), Tahiti, Nova Caledônia, Papua Nova Guiné, Austrália (Wang *et al.*, 2008) e Equador (Pincay *et al.*, 2009). Estudos indicam que cerca de 2800 casos em mais de 30 países já foram registrados em todo o mundo (Wang *et al.*, 2008). Nos Estados Unidos esta doença está sendo tratada como problema de saúde pública emergente (Diaz, 2008). A figura 3 ilustra a distribuição geográfica do *A. cantonensis* no mundo.



**Figura 3.** Mapa da ocorrência de angistrongilíase cerebral no Mundo (modificado de Wang *et al.*, 2008)

No Brasil, em 2006 foi identificado o primeiro caso autóctone em Cariacica, Espírito Santo (Caldeira *et al.*, 2007). Outros casos de infecção bem reportados ocorreram no estado de Pernambuco (Lima *et al.*, 2009) e São Paulo (Espírito-Santo *et al.*, 2013). Em recente trabalho, Morassutti *et al.* (2014) faz um levantamento completo da distribuição de casos, hospedeiros intermediários e definitivos infectados já encontrados no Brasil (Figura 4). Esse trabalho reporta que mais de 84 casos suspeitos foram investigados nos últimos anos no Brasil, sendo mais de 40% deles positivos para infecção por *A. cantonensis*, estando distribuídos em Espírito Santo (3), Porto Alegre/ RS (1), Recife/ PE (9), Rio de Janeiro (2), São José dos Pinhais/ PR (1) e São Paulo (13) (Morassutti *et al.*, 2014).



**Figura 4.** Distribuição geográfica de hospedeiros intermediários, definitivos e casos humanos positivos para *A. cantonensis* no Brasil (Fonte: Morassutti *et al.*, 2014).

O Brasil pode ser considerado como uma área de alto risco para meningite eosinofílica, devido à ocorrência de diversos hospedeiros intermediários e definitivos

susceptíveis a infecção por *A. cantonensis*. Somado a isso, atualmente, a facilidade com que as pessoas podem chegar a locais distintos pelo mundo acarretou no aumento de novos casos da doença e justifica a consideração no diagnóstico diferencial de doenças neurológicas na medicina de viajantes (Slom *et al.*, 2002; Leone *et al.*, 2007).

#### 1.1.1.4 Diagnóstico da angiostrongilíase cerebral

O diagnóstico desta doença se dá pela avaliação dos sintomas clínicos e exames laboratoriais. Exames de imagem como ressonância magnética nuclear, podem revelar lesões no cérebro e permitem o acompanhamento de complicações, embora não possam discernir diferentes infecções cerebrais (Tsai *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2005). É importante considerar a história de consumo de crustáceos ou moluscos crus associado a manifestações de meningoencefalites (Eamsobhana, 2006).

A eosinofilia acima de 10% pode ser indicativa da infecção por *A. cantonensis*, já que nesses casos os pacientes apresentam elevada taxa de eosinófilos no líquido. Além disso, a maioria dos pacientes também apresenta eosinofilia no sangue periférico (Pien & Pien, 1999). Um estudo de Sawanyawisuth & Sawanyawisuth (2010), demonstrou que eosinofilia periférica associada a história prévia de consumo de moluscos apresenta 76,6% de sensibilidade e 80,2% de especificidade para o diagnóstico de infecções causadas por *A. cantonensis*. Embora bastante sugestiva, a eosinofilia pode estar ausente no LCR ou ser causada por outros helmintos como *Gnathostoma*, *Paragonimus* e *Taenia solium* (Cross, 1987; Jaroonvesama, 1988), de maneira que a confirmação do diagnóstico se dá pelo encontro de larvas no LCR ou na cavidade orbitária do indivíduo infectado ou por testes imunológicos.

Na avaliação bioquímica, o LCR de pacientes com meningite eosinofílica apresenta proteínas aumentadas e glicose levemente diminuída (Punyagupta *et al.*, 1975) e, com relação às características físicas, é comum a descrição de uma amostra límpida ou levemente turva e incolor (aspecto de água de coco, considerado um achado patognomônico da infecção), o que facilita a diferenciação de muitas

outras infecções do SNC, incluindo as infecções bacterianas, fúngicas e até por outros parasitos, como o *Gnathostoma* spp (Sawanyawisuth & Sawanyawisuth, 2010). O encontro de larvas de *A. cantonensis* no LCR ocorre raramente (Eamsobhana, 2006), fazendo com que testes sorológicos sejam uma alternativa importante para o diagnóstico. Neste sentido, diversos marcadores moleculares têm sido identificados como alvos antigênicos potenciais para o imunodiagnóstico da angiostrongilíase, e técnicas moleculares como ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*), Dot Blot, Western Blot, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e PCR real-time tem sido amplamente empregados para o diagnóstico laboratorial da meningite eosinofílica (Eamsobhana *et al.*, 2001; Caldeira *et al.*, 2003; Qvarnstrom *et al.*, 2010; Morassutti *et al.*, 2014).

Desde os anos 80 diversos trabalhos tem dedicado esforços para o desenvolvimento de métodos laboratoriais para o diagnóstico de infecções por *A. cantonensis*. Em 1982, Cross & Chi descreveram o primeiro ELISA para detecção de anticorpos em pacientes com angiostrongilíase cerebral, onde utilizavam extrato total de vermes adultos e larvas (Cross & Chi, 1982). Nos anos que se seguiram, foram publicados diversos trabalhos utilizando o extrato total de vermes adultos, principalmente das fêmeas, e frações parcialmente purificadas deste extrato na tentativa do desenvolvimento de um método com suficiente sensibilidade e especificidade (Tabela 1). A maioria dos estudos que utilizam métodos imunológicos demonstraram que os anticorpos presentes no soro dos pacientes infectados reconhecem mais especificamente proteínas com peso molecular de 29 e 31 kDa, presentes em extratos de vermes adultos (Akao *et al.*, 1992; Eamsobhana *et al.*, 1995; Nuamtanong, 1996; Sawanyawisuth *et al.*, 2011).

**Tabela 1.** Principais trabalhos buscando alternativas para o diagnóstico da angiostrongilíase cerebral.

Referência	Alvo do teste	Método
Chen, 1986	Frações do antígeno total (ET) de lavas e vermes adultos	ELISA



<b>Shih &amp; Chen, 1991</b>	Anticorpo monoclonal para detecção de antígeno circulante (banda de 91-kDa presente no antígeno ES de L3 cultivadas <i>in vitro</i> )	Ensaio enzimático com fluorescência aplicado para amostras de soro e LCR (88% de sensibilidade e especificidade)
<b>Yen &amp; Chen, 1991</b>	Moléculas parcialmente purificadas a partir de ET de L5 e vermes adultos	ELISA
<b>Akao et al., 1992</b>	Bandas de 29 e 31 kDa a partir de ET de verme fêmea	Imunodiagnóstico
<b>Eamsobhana et al., 1995</b>	Antígenos circulantes	ELISA sanduíche
	ET de verme fêmea	ELISA (100% de sensibilidade e 88,8% de especificidade)
<b>Naumtanong, 1996</b>	Antígeno de 31 kDa de ET de verme fêmea	Western blot (WB) (reatividade cruzada com soros de pacientes infectados com <i>Trichinella spiralis</i> , <i>Trichuris tricuris</i> e <i>Opisthorchis viverrini</i> )
<b>Chye et al., 1997</b>	Anticorpo monoclonal para detecção da banda de 204 kDa de ET de L5	ELISA, aplicado para amostras de soro e LCR (Sensibilidade de 91% e especificidade de 98%)
<b>Eamsobhana et al., 2001</b>	Antígeno de 31 kDa purificado de ET de verme Fêmea	Dot Blot (100% de sensibilidade e especificidade)
<b>Caldeira et al., 2003</b>	Amplificação do espaço interno transcrito do DNA ribossomal (ITS)2	PCR convencional
<b>Eamsobhana et al., 2003, 2006</b>	Antígeno de 31 kDa purificado de ET de verme fêmea	KIT Dot Blot ELISA – principal método diagnóstico utilizado na Tailândia
<b>Intapam et al., 2003</b>	Banda de 29 kDa do ET de vermes fêmea	ELISA - IgG4 (sensibilidade de 89,2% e especificidade de 75%)
<b>Qvarnstrom et al., 2010</b>	Amplificação do espaço interno transcrito do DNA ribossomal (ITS)1	PCR real-time ( detecção de DNA correspondente a menos de 1 larva em LCR)
<b>Morassutti et al., 2012</b>	Antígeno de 31 kDa – Proteínas 14-3-3, domínio NAC e Ep31	Gel SDS-PAGE 2DE, WB e Espectrometria de massas – caracterização molecular do antígeno. Glicídios presentes no antígeno são essenciais para o reconhecimento imunológico

<b>Morassutti et al., 2012b</b>	Antígenos presentes no ES de vermes adultos – Lec-5 e ES-7	Gel SDS-PAGE 2DE, WB e Espectrometria de massas – caracterização de novos alvos para diagnóstico
<b>Eamsobhana et al., 2013</b>	Antígeno de 31 kDa purificado	Dot Blot modificado – DIGFA (do inglês <i>immunogold filtration assay</i> ) – (100% de sensibilidade e especificidade)
<b>Morassutti et al., 2013</b>	Produção de proteínas recombinantes para o diagnóstico: Lec-5, ES-7, 14-3-3, NAC e Ep31	Técnicas moleculares para produção de proteínas recombinantes e WB
<b>Chen et al., 2014</b>	microRNA aca-miR-146a derivado de L4	PCR (sensibilidade e especificidade de 83 e 86,7%, respectivamente, testando soros de ratos)

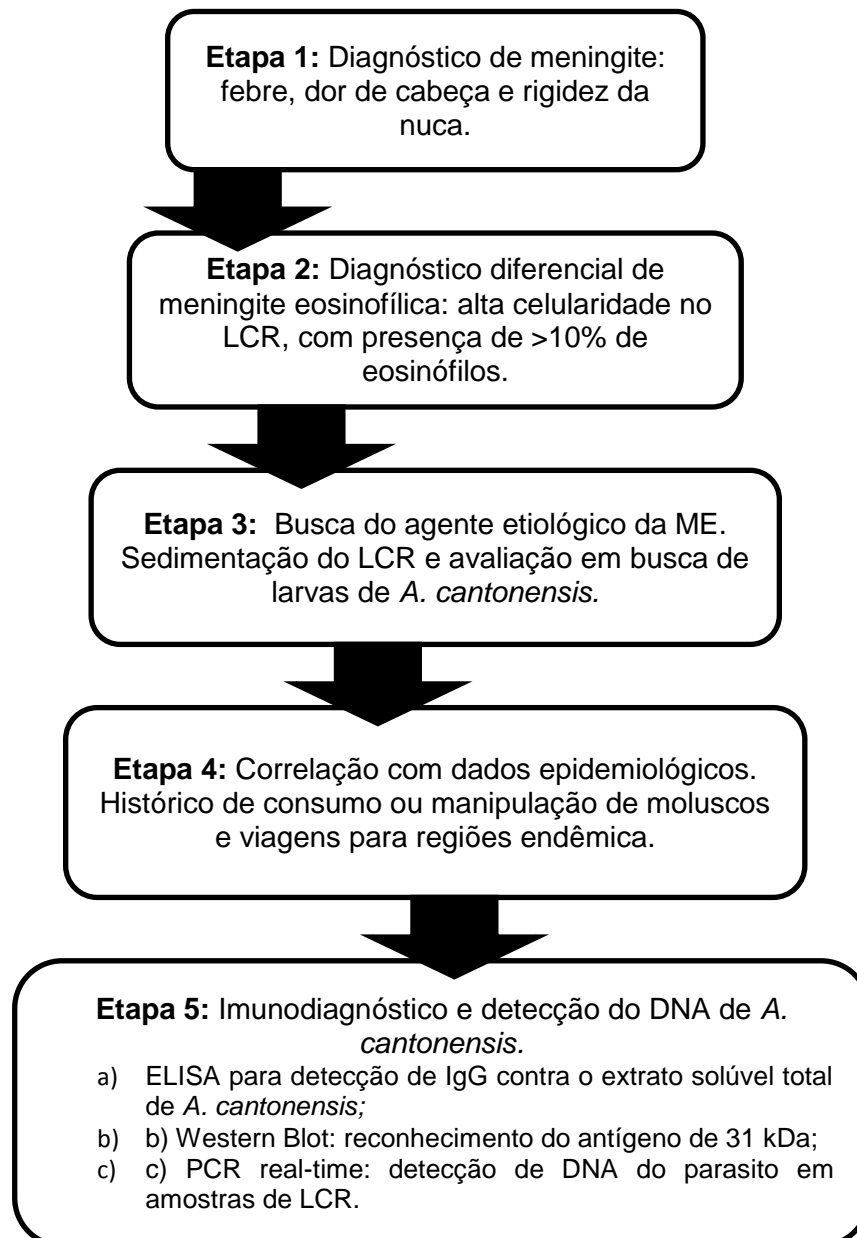
Através do trabalho de Nuamtanong (1996), ficou claro que a banda de 31 kDa seria a melhor opção para diagnóstico uma vez que esta, em relação a banda de 29 kDa, demonstrou ter maior especificidade e menor reatividade cruzada quando soros de pacientes infectados com outros parasitos foram testados. Anticorpos específicos contra a banda de 31-kDa podem ser encontrados também no LCR, porém os testes demonstraram maior sensibilidade quando o soro foi utilizado (Yen & Chen 1991). Anos depois, a purificação da banda de 31-kDa por eletroeluição a partir de géis de SDS-PAGE resultou em aumento da sensibilidade e especificidade do diagnóstico pelo método de ELISA (Eamsobhana *et al.*, 2001). Um Dot Blot foi desenvolvido a partir deste componente purificado, e, atualmente, esse é o principal método diagnóstico utilizado para detecção da infecção por *A. cantonensis* na Tailândia (Eamsobhana *et al.*, 2003, 2006).

A avaliação dos anticorpos capazes de reconhecer moléculas do antígeno de *A. cantonensis* demonstrou que imunoglobulinas tipo IgG1 possuem maior sensibilidade para o imunodiagnóstico da angiostrongilíase (Intapan *et al.*, 2002). Já o IgG4 é capaz de detectar com alta especificidade (95%) a banda de 29-kDa presente no extrato total de vermes adultos do parasito e as classes IgA e IgM não são úteis para o imunodiagnóstico (Intapan *et al.*, 2003).

Uma importante limitação para os imunodiagnósticos baseados na detecção de anticorpos é o diagnóstico de infecções recentes, já que a produção de anticorpos capazes de serem detectados leva determinado tempo, e geralmente

ocorre após o aparecimento dos sintomas. Desta maneira, foram desenvolvidos métodos baseados em PCR, capazes de detectar diretamente DNA do parasito em pequenas quantidades. Caldeira *et al.* (2003) desenvolveu uma PCR convencional, tendo como alvo a amplificação do espaço interno transcrito do DNA ribossomal (ITS)2, e, anos depois, uma PCR *real-time*, cujo alvo é a amplificação da região ITS1, foi desenvolvida em colaboração com o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) (Qvarnstrom *et al.*, 2010). A PCR *real-time* desenvolvida possui alta sensibilidade, uma vez que é capaz de detectar DNA correspondente a menos de uma larva em LCR, porém o teste ainda não está completamente validado para utilização.

Na falta de uma padronização para diagnóstico, Morassutti e colaboradores (2014) propuseram um algoritmo para o diagnóstico da angiostrongilíase cerebral que consiste em cinco etapas, incluindo diagnóstico diferencial de meningites, coleta de dados epidemiológicos e exames laboratoriais (Figura 5).



**Figura 5.** Algoritmo para o diagnóstico da angiostrongilíase cerebral, idealizado por Morassutti e colaboradores (2014).

#### 1.1.1.5 Busca de um diagnóstico padrão para a angiostrongilíase

Atualmente o diagnóstico de infecções parasitárias praticamente se limita ao exame microscópico de amostras de sangue, tecidos, fluídos corporais, fezes e urina, onde se busca a presença física de alguma forma parasitária (larvas, ovos, cistos, trofozoítos ou vermes). Isto requer pessoas treinadas, equipamentos e larga

estrutura laboratorial e mesmo assim o diagnóstico pode não ser feito em casos de baixa carga parasitária, muitas vezes devido a sensibilidade das técnicas utilizadas ou as condições de coleta da amostra, que podem exigir procedimentos específicos que aumentam as chances para a visualização das formas parasitárias, mas que nem sempre são aplicadas.

Exames sorológicos resolveram alguns desses problemas, mas a sorologia também enfrenta limitações. O desenvolvimento de técnicas imunológicas para o diagnóstico de infecções parasitárias tem sido dificultado principalmente pela reatividade cruzada dos antígenos entre diferentes helmintos (van Remoortere *et al.*, 2003; Romasanta *et al.*, 2003; Ishida *et al.*, 2003), sendo que diversos trabalhos indicam que grande parte dessa reatividade deve-se a presença de glicídios no antígeno utilizado (Alarcón de Noya *et al.*, 2000). Embora, alguns glicídios como F-LDN e LDN-diF, somente encontrados no gênero *Schistosoma* (van Remoortere *et al.*, 2000) ou a tyvelose, somente produzida por *Trichinella spiralis* sejam altamente específicos para diagnóstico. Um dissacarídeo sintético, tyvelose- $\beta$ -GalNAc foi produzido, conjugado com albumina bovina e utilizado em testes de ELISA, tendo apresentado 100% de correlação com a presença da doença, sendo reconhecido por anticorpos anti-tyvelose específicos (Bruschi *et al.*, 2001).

No caso de infecções por *A. cantonensis*, ainda não existe um teste comercialmente disponível para o diagnóstico. Atualmente o diagnóstico se dá pela detecção da banda de 31-kDa por Dot Blot ou Western Blot, produzidos a partir de extratos totais dos vermes ou antígeno parcialmente purificado.

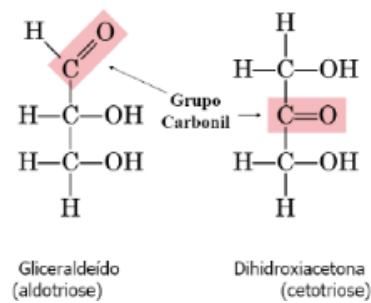
EAMSOBHANA *et al.* (1998) demonstraram que o antígeno de 31-kDa possuía resíduos de açúcar, e que estes não afetavam o reconhecimento pelo anticorpo (Eamsobhana *et al.*, 2001; Eamsobhana & Yong, 2009), no entanto, a identidade deste antígeno permaneceu desconhecida. Em 2012, Morassutti *et al.* isolaram e caracterizaram o antígeno de 31-kDa usando eletroforese uni e bidimensional (2DE) aliado a espectrometria de massas. A análise por 2DE revelou a presença de quatro *spots*, onde pelo menos três diferentes proteínas em cada um dos *spots* foram identificadas: subunidade épsilon do coatomero, proteína 14-3-3 e proteína contendo domínio NAC. Interessantemente, após a realização de experimentos de oxidação de resíduo tiol pelo *m*-periodato de sódio, foi possível

concluir que os grupamentos glicídicos da(s) proteína(s) são cruciais para o reconhecimento pelos anticorpos de indivíduos infectados com *Angiostrongylus* (Morassutti *et al.*, 2012). Posteriormente, após tentativas de produzir as proteínas presentes no componente de 31 kDa de maneira recombinante, os autores observaram que nenhum dos sistemas de expressão utilizados, procariótico ou eucariótico, foi suficiente para obtenção de proteínas capazes de serem reconhecidas em testes imunológicos (Morassutti *et al.*, 2013).

A preparação de antígenos em larga escala é um processo complicado e trabalhoso. A clonagem molecular e a expressão de proteínas recombinantes representa uma alternativa viável para obtenção em grande quantidade de um antígeno específico para uso em imunodiagnóstico (Morassutti *et al.*, 2012). Somado a isso, sabe-se que é possível desenvolver testes para o diagnóstico de ambas as espécies de *Angiostrongylus* de importância médica para o homem, *A. cantonensis* e *A. costaricensis*, a partir de antígeno de uma única espécie (Ben *et al.*, 2010). Como foi demonstrado que o antígeno de 31-kDa de *A. cantonensis* possui alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da angiostrongilíase cerebral, mas que o reconhecimento imunológico depende da fração glicídica, o estudo dos glicídios associados a este antígeno poderia viabilizar a produção de um teste diagnóstico comercial. Outrossim, o estudo dos demais glicoconjugados do parasito poderá favorecer a descoberta de novos alvos para diagnóstico.

### 1.1.2 Glicídios e Glicoconjugados

Carboidratos são substâncias orgânicas que contêm carbono, hidrogênio e oxigênio. São denominadas de sacarídeos, glicídios, oses, hidratos de carbono ou açúcares. Na sua forma mais simples a fórmula geral é  $C_nH_{2n}O_n$  (1:2:1). Variam de açúcares simples, contendo de três a nove átomos de carbono, até polímeros muito complexos. Quimicamente são polihidroxi-aldeídos ou polidroxí-cetona (Murray *et al.*, 2002) (Figura 6).



**Figura 6.** Estrutura dos açúcares nas suas formas mais simples.

As funções dos carboidratos em processos biológicos vão além do papel essencial no metabolismo energético das células e incluem a composição da parede de bactérias, fungos e plantas, papel nos eventos de reconhecimento, interação e sinalização intra e intercelular, desenvolvimento embrionário, fertilização, replicação viral e infecções parasitárias (Fincher, 2009; Hendel *et al.*, 2005).

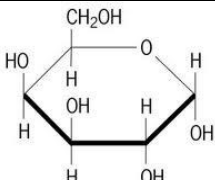
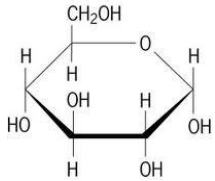
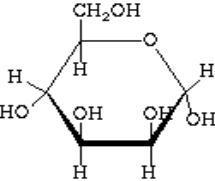
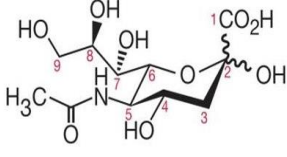
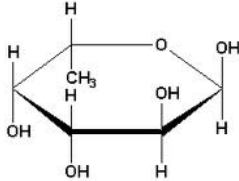
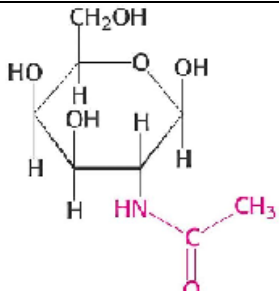
Além disso, oligossacarídeos codificam informações biológicas, as quais variam devido à constituição de açúcares, sequência e conformação dos mesmos na cadeia. Por exemplo, quando glicanos estão ligados a polipeptídeos, formando glicoproteínas, podem influenciar na conformação de proteínas e consequentemente modular as funções e interações desta molécula. Os principais glicoconjugados encontrados em parasitos e humanos são as glicoproteínas e glicolipídeos.

Na natureza já foram descritos mais de 200 tipos de monossacarídeos, sendo que dentre esses somente oito predominam em glicoproteínas humanas (Murray *et al.*, 2000) (Tabela 2). O interesse pelo estudo e caracterização de glicídios tem crescido muito nos últimos anos devido a participação dessas moléculas nos mais complexos processos, como a variabilidade proteica, por exemplo. Atualmente, assim como os ácidos nucleicos e aminoácidos, os glicídios são considerados como parte de um alfabeto único dentro da biologia.

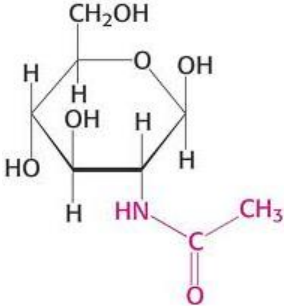
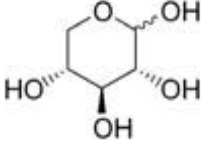
A diversidade entre as proteínas seria bastante limitada não fosse a adição de glicídios em muitas delas. Além disso, a glicosilação pode gerar efeitos na molécula proteica como: resistência à proteólise e desnaturação, alteração de ponto isoelétrico, aumento de solubilidade, aumento de interação com proteínas de choque térmico, mudanças de conformação secundária, variação de interação e

reconhecimento com outras proteínas e carboidratos, alteração de transporte e secreção, aumento da estabilidade conformacional, entre outros (Sears & Wong, 1998; Hanson *et al.*, 2009).

**Tabela 2.** Tipo de açúcares que predominam em glicoconjugados presentes em humanos.

Açúcar	Tipo	Comentários	Estrutura
<b>Galactose</b>	Hexose	Abreviação: Gal.	
<b>Glucose</b>	Hexose	Abreviação: Glc. Ocorrem em N-glicoproteínas. Constituem os fatores de coagulação.	
<b>Manose</b>	Hexose	Abreviação: Man. Ocorrem mais comumente em N-glicoproteínas.	
<b>Ácido N-Acetilneuramínico</b>	Ácido Siálico (9 C)	Abreviação: NeuAc. Açúcar terminal em N ou O-glicoproteínas. Muito frequente em humanos.	
<b>Fucose</b>	Deoxihexose	Abreviação: Fuc. Açúcar interno ou externo em N ou O-glicoproteínas. Externo: Ligados a GlcNac para formar ligações N-glicosídicas. Interno: Ligados ao grupo OH de Serina.	
<b>N-acetilgalactosamina</b>	Aminohexose	Abreviação: GalNac. Presente em N ou O-glicoproteínas.	



<b>N-acetilglucosamina</b>	Aminohexose	<p>Abreviação: GlcNac.          Açúcar que se liga a cadeia polipeptídica via Asp em N-glicoproteínas. Podem ser encontrados em outros locais na constituição de glicoproteínas.</p>	
<b>Xilose</b>	Pentose	<p>Abreviação: Xyl.          Encontra-se ligada ao OH de Ser na maioria dos proteoglicanos. Normalmente ligado a 2 resíduos de Gal, formando trissacarídeos.</p>	

A glicosilação consiste na ligação de um ou vários monossacarídeos a cadeias polipeptídicas, tratando-se da alteração co- /pós-traducional mais frequente e complexa que ocorre em proteínas, sendo observada em praticamente todos os organismos vivos, de eucariotos a procariotos (Archea e Eubactérias) (Spiro, 2002). Estima-se que 50% das proteínas existentes sejam glicosiladas em um ou mais sítios (Apweiler *et al.*, 1999), sendo este o processo o mais variável em termos de modificação pós-traducional em proteínas.

O processo de glicosilação pode envolver diversos tipos de aminoácidos e monossacarídeos, o que gera grande variabilidade entre as moléculas e influencia diretamente nas interações da proteína com outras moléculas (Medvedová & Farkas, 2004; Slawson *et al.*, 2006). A grande variação de glicídios e glicoproteínas existentes deve-se a (1) número de ligações: existem pelo menos 41 tipos de ligações entre carboidratos (13 tipos de açúcares são conhecidos como sendo uma parte glico-conjugados) e aminoácidos; (2) tipos de ligações entre carboidrato e aminoácido: pode ser  $\alpha$  ou  $\beta$ ; (3) posição das ligações: podem variar entre 1-2, 1-3, 1-4, 1-6; (4) substituições terminais adicionadas em modificações pós-traducionais: sulfatação, fosforilação, metilação, acetilação, entre outros, que são capazes de causar modificações importantes em relação a função da glicoproteína sem, entretanto, alterar a sequência de glicídios presente na mesma, sendo essa uma

maneira bastante conveniente de gerar diversidade entre as proteínas (Solis *et al.*, 2015).

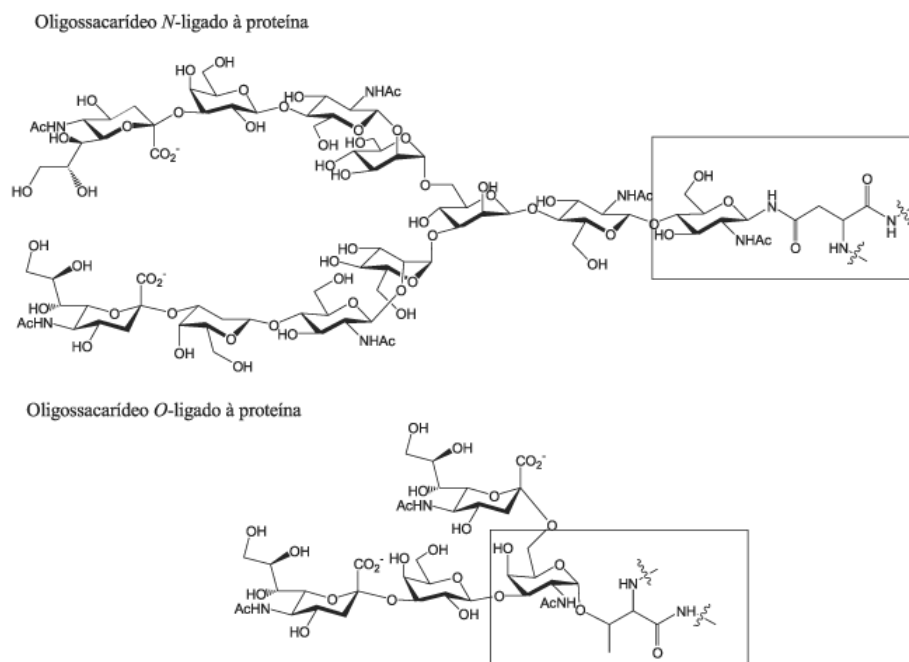
Fica claro que a adição de glicídios é uma alteração extensa, observada pela proporção que os resíduos de açúcar podem ocupar na glicoproteína, variando entre 1 e 85% do peso total da molécula. Glicoproteínas podem ser encontradas dentro de células, no citoplasma e em organelas intracelulares, nas membranas celulares externas e na matriz e fluídos extracelulares (Zachara *et al.*, 2004). Em humanos, glicoproteínas podem acomodar entre dois e seis monossacarídeos lineares, juntamente com suas cadeias laterais potenciais, que contem glicídios e modificações variadas (Cummings, 2009). De acordo com o total de glicídios presentes nas células, observa-se um elevado grau de dependência das células por essas macromoléculas. Cada tipo de célula pode apresentar um perfil glicídico único. Portanto, os glicídios seriam úteis para descrever e diferenciar diferentes tipos celulares (Solis *et al.*, 2015).

Essa modificação é incrivelmente sensível a fatores genéticos ou ambientais, bem como a infecções, o que caracteriza o glicofenótipo e as diferenças que podem ocorrer no perfil de glicídios observados em organismos de uma mesma espécie. O investimento na codificação genética dos glicogenes (genes envolvidos nos processos de glicosilação) revelou que cerca de 1% das regiões codificantes do genoma humano pode ser responsável pela codificação de glicosiltransferases (Wiley, 2009).

Para que a variabilidade estrutural característica dos glicídios seja possível, uma maquinaria enzimática altamente refinada para síntese de glicídios precisa estar disponível. A biossíntese de glicoproteínas é um processo que envolve a ação coordenada de diversas enzimas, glicosidases e glicosiltransferases, ao mesmo tempo em que a interação de uma variedade de fatores torna a regulação dos glicídios viável. Esses fatores incluem concentração de substrato (monossacarídeos) disponível no Complexo de Golgi (CG) e disponibilidade de diferentes glicosiltransferases, glicosidases e enzimas para a introdução de modificações sítio-específico, que podem sofrer modificações ao longo do crescimento celular, diferenciação e desenvolvimento (Helenius & Aebi, 2001; Spiro, 2002). O tipo de glicídio que é incorporado à proteína e o tipo de ligação entre essas duas moléculas

influenciam diretamente nas propriedades de glicoproteínas, interferindo em suas funções e interações (Cipollo *et al.*, 2005). O conhecimento da estrutura e composição das ligações entre glicídios e proteínas facilitam análises que objetivam a caracterização da glicoproteína, glicídio e, em especial, do glicoma de uma célula ou organismo, o que já foi comparado a uma assinatura fenotípica.

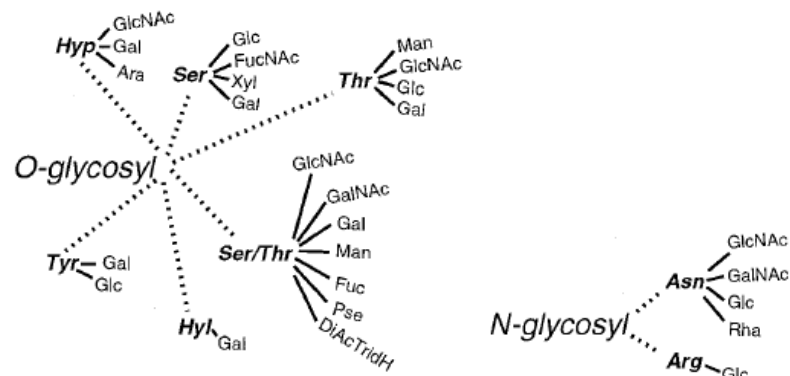
São conhecidos cinco tipos de ligações entre carboidratos e proteínas, as quais envolvem treze monossacarídeos e oito aminoácidos: C-glicosilação, fosfoglicosilação, gliptação (ou âncora de GPI), O-glicosilação e N-glicosilação (Spiro, 2002; Schmidt *et al.*, 2003, Abu-Qarn *et al.*, 2008). O- e N-glicosilação são as mais importantes e mais freqüentes na natureza (Figura 7). As conformações dessas ligações glicosídicas e seus efeitos sobre a estrutura proteica consistem em uma ampla área de conhecimento ainda não totalmente explorada.



**Figura 7.** Exemplos da estrutura de N- e O-Glicoproteínas (Adaptado de: Ito & Matsuo, 2003).

Glicoproteínas podem conter N- ou O-glicídios ou ambos ao mesmo tempo e os dois tipos são produzidos por parasitos, num processo de biossíntese que se assemelha bastante a síntese que ocorre em células humanas. Enquanto o

processo de *N*-glicosilação é mais conservado, tendo uma sequência consenso sempre presente na superfície da proteína, a ligação *O*-glicosídica é mais diversa e versátil, já que pode envolver um número grande de aminoácidos e monossacarídeos (Figura 8), embora poucas sequências consenso conservadas tenham sido identificadas (Spiro, 2002).



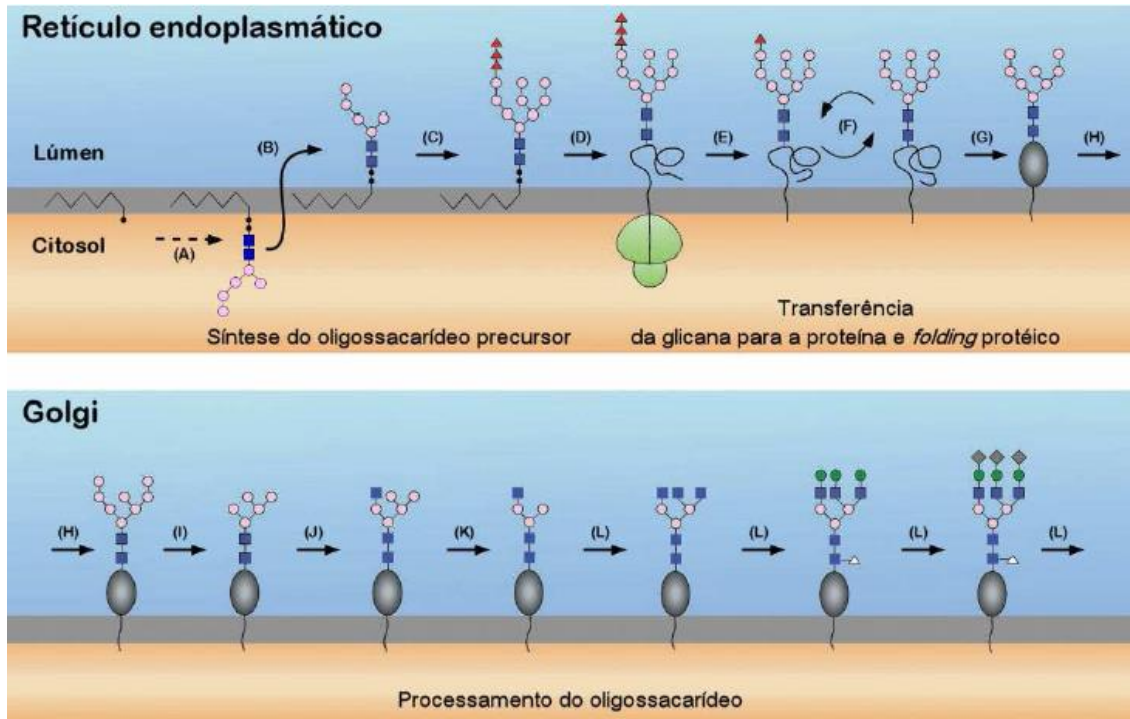
**Figura 8.** Tipos de Ligações *O*- e *N*-glicosídicas já descritas (Adaptado de Spiro, 2002).

#### 1.1.2.1 Biossíntese de *N*-Glicoproteínas em vertebrados e invertebrados

A *N*-glicosilação é iniciada pela transferência de um oligossacarídeo ligado a um lipídeo ( $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{Glc}_3$ ) para uma sequência aceptora presente na superfície da proteína ( $\text{Asn-X-Ser/Thr-R}$ , onde “X” pode ser qualquer um dos 20 aminoácidos naturais, exceto prolina). É formada uma ligação *N*-glicosídica entre o grupamento amino do aminoácido asparagina (Asn) e um resíduo de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) do glicídio (Marshall, 1974; Gavel & Von Heijne, 1990). Em eucariotos esse processo acontece na parte interna do Retículo Endoplasmático (RE) e após essa primeira adição todas as *N*-glicoproteínas possuem a mesma composição em termos de glicídio.

Ainda no RE, por ação de diversas enzimas, os resíduos de Glc do glicídio inicial são eliminados. Esse processo faz parte do controle de qualidade do processo de *folden* de proteínas. Em seguida, os *N*-glicídios passam por uma etapa de remodelamento no CG. Nessa organela o polissacarídeo inicial, agora  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ ,

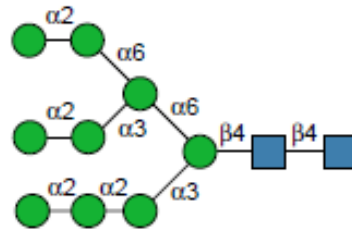
passará por uma resíntese, etapa responsável por gerar *N*-glicídios complexos em termos de ramificações, comprimento das antenas, estrutura terminal e padrões de substituições de glicídios terminais (Figura 9) (Wiley, 2009).



**Figura 9.** Biossíntese de glicoproteínas *N*-glicosiladas. A *N*-glicosilação ocorre em diversas etapas, tendo início no RE, com a adição do glicídio inicial ao polipeptídeo (D). Em seguida, ocorrem diversos passos de modificações na cadeia polipeptídica e glicídica (E-H), com eliminação de resíduos de Glc do glicídio inicialmente adicionado. Posteriormente, no CG, ocorrem modificações e adições de novos glicídios a glicoproteína (I-L). Azul = GlcNAc; Rosas = Man; Vermelhas = Glc; Verdes = Gal; Cinzas = NeuAc; Brancas = Fuc. Adaptado de Helenius & Aebi, 2001.

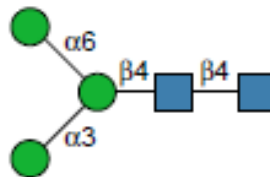
Diferentes enzimas (glicosidases, glicosiltransferases e enzimas responsáveis por modificações sítio-específica) estão envolvidas na etapa de resíntese de *N*-glicoproteínas e influenciam diretamente no tipo de glicídio que será formado. Parasitos, por exemplo, podem apresentar quatro tipos de *N*-glicídios: glicídios com alto conteúdo de manose ou oligomanose; glicídios truncados; glicídios complexos e; glicídios híbridos (Haslam *et al.*, 2001).

a) *Glicídios com alto conteúdo de manose (Man<sub>5-9</sub>HexNAc<sub>2</sub>)*: Formados pela ação das enzimas  $\alpha$ -glucosidase e  $\alpha$ -manosidase que adicionam glicídios ao glicídio precursor, sem posteriores modificações do glicídio (Figura 10).



**Figura 10.** Estrutura de um glicídio com alto conteúdo de manose. ● = Manose; ■ = GlcNAc. (Adaptado de Haslam *et al.*, 2001)

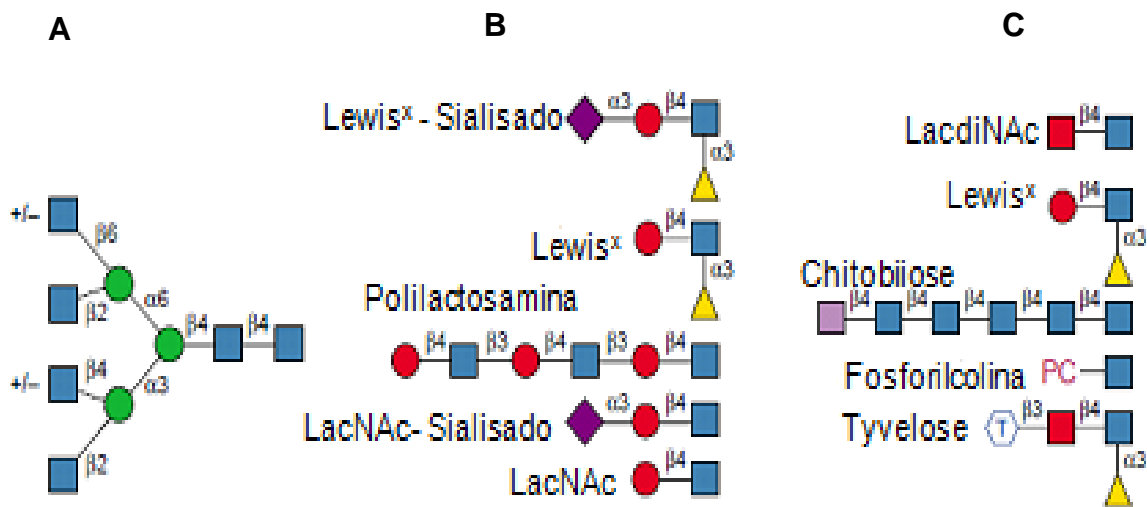
b) *Glicídios Truncados (Fuc<sub>0-1</sub>Hex<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>)*: Esse tipo de glicídio ocorre principalmente em invertebrados e são caracterizados por sofrer a remoção de algumas  $\alpha$ -manoses (Figura 11).



**Figura 11.** Estrutura de um glicídio truncado. ● = Manose; ■ = GlcNAc. (Adaptado de Haslam *et al.*, 2001)

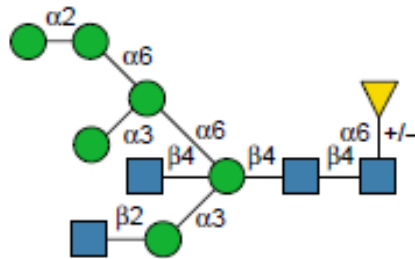
c) *Glicídios Complexos (Fuc<sub>0-1</sub>Hex<sub>3-5</sub>GlcNAc<sub>3-5</sub>)*: Esse tipo de glicídio sofre a remoção de  $\alpha$ -manoses e subsequente adição distal de um glicosil. São caracterizados por possuírem variado número de antenas, geralmente entre duas e quatro. A síntese do glicídio complexo envolve três etapas principais: c1) Modificação: Adição de resíduos de GlcNAc às manoses da molécula (Figura 12A). Adicionalmente, podem ser acrescentados resíduos de  $\beta$ -manoses aos resíduos de GlcNAc. Em plantas e invertebrados esses resíduos de  $\beta$ -manoses podem ser substituídos por xilose. Uma fucose pode ser adicionada ao resíduo de GlcNAc proximal, essa fucose é  $\alpha_{1,6}$  ligada, no caso de mamíferos, e  $\alpha_{1,6}$  ou  $\alpha_{1,3}$  ligada no caso de plantas, helmintos e invertebrados; c2) Alongamento: Etapa onde as antenas do glicídio são convertidas em um arranjo extenso no CG *trans*. Mamíferos

estendem as antenas pela adição de  $\beta$ -Gal, formando  $\text{Gal}\beta_{1-4}\text{GlcNAc}$ , conhecido também por antena LacNAc (Figura 12B). A antena pode ser ainda aumentada pela adição sequencial de GlcNAc e Gal, o que leva a uma estrutura conhecida como polilactosamina, que é a repetição em sequência de LacNAc. Alguns raros mamíferos podem substituir a  $\beta$ -Gal por  $\beta$ -GalNAc, resultando na estrutura conhecida como lacdiNAc ( $\text{GalNAc}\beta_{1-4}\text{GlcNAc}$ ). Em invertebrados os glicídios complexos contêm antenas formadas tanto por LacNAc quanto por LacdiNAc; c3) Capa: A finalização da síntese do glicídio complexo se dá pela adição de uma “capa”, que consiste em um resíduo diferenciado no final do glicídio. Nos mamíferos a capa mais comum é a adição de ácido siálico (Figura 12B), que pode ocorrer em parasitos protozoários, mas raramente em helmintos. Outras capas que já foram observadas em glicídios de mamíferos são fucose, galactose, GalNAc e sulfato. Em invertebrados, além das modificações já citadas, também pode ocorrer adição de resíduos de tyvelose ou fosforilcolina e O-metilação (Figura 12C).



**Figura 12.** Representação esquemática da estrutura de glicídios complexos. A) glicídio complexo imaturo; B) Estruturas diferentes que podem ocorrer nas antenas de glicídios complexos de mamíferos e as capas frequentemente adicionadas; C) Estruturas diferentes que podem ocorrer nas antenas de glicídios complexos de parasitos e as capas frequentemente adicionadas. ● = Manose; ■ = GlcNAc; ● = Gal; ■ = GalNAc; ■ = HexNAc; ▲ = Fucose; ◆ = NeuAc. (Adaptado de Haslam *et al.*, 2001)

d) *Glicídios híbridos*: esse tipo de *N*-glicídio é um misto de glicídio com alto conteúdo de manose e glicídio complexo. Em geral um dos braços possui uma antena com alto conteúdo de manose e outro uma antena de estrutura complexa (Figura 13).



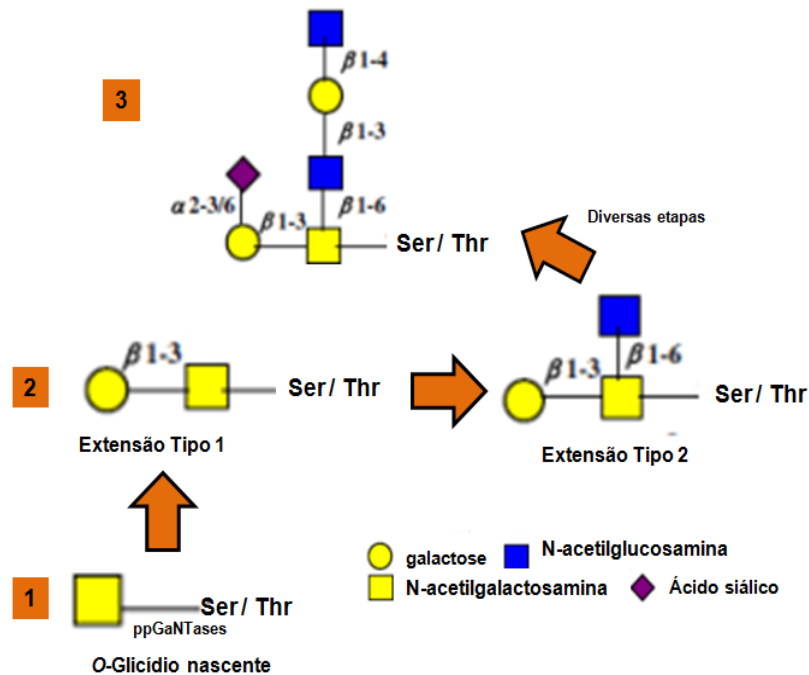
**Figura 13.** Estrutura de glicídio híbrido. ● = Manose; ■ = GlcNAc; ▲ = Fucose. (Adaptado de Haslam *et al.*, 2001)

#### 1.1.2.2 Biossíntese de O-Glicoproteínas em vertebrados e invertebrados

O-glicídios são constituídos passo a passo através de vias conhecidas, com a participação de diferentes glicosiltransferases (Brockhausen, 2007). Em mamíferos a biossíntese desse tipo de glicídio é iniciada no CG *Cis*, pela adição de um resíduo de GalNAc a um aminoácido, Prolina, Serina ou Treonina. Ferramentas matemáticas e de bioinformática permitiram a identificação de importantes propriedades da ligação O-glicosídica, entre elas a preferência pelo aminoácido Prolina e a impossibilidade desta ligação ocorrer na presença de aminoácidos aromáticos próximo ao sítio de ligação (Haslam *et al.*, 2001; Christlet & Veluraja, 2001). Na sequência, são formadas diferentes estruturas, que variam conforme a adição de diferentes açúcares (Figura 14).

A presença de O-glicídios em estruturas tipo mucina é comumente encontrada em parasitos helmintos, com substituições e extensões variando de acordo com a espécie (Koo & Dell, 2001, Nyame *et al.*, 2004). Mucinas são proteínas altamente O-glicosiladas e representam o arranjo de O-glicídios presentes na superfície de células, matriz extracelular e mucosas. Em humanos, essas glicoproteínas já foram implicadas em diversos tipos de doenças (Corfield, 2014).





**Figura 14.** Esquema de biossíntese de O-glicoproteínas. 1: Adição do glicídio precursor GalNAc pela enzima ppGaNTase; 2: Exemplo de extensões do esqueleto de O-glicídios; 3: exemplo de alongamento e capas que podem ocorrer em O-glicídios

As mucinas possuem regiões com domínios ricos em aminoácidos Prolina/Treonina/Serina (domínios PTS), que servem como sítios para O-glicosilação. Os resíduos de Ser/Thr são reconhecidos por uma família de enzimas, UDP-N-acetilgalactosamina: polipeptídeo N-acetilgalactosaminiltransferases (ppGaNTases), responsáveis pela primeira etapa da biossíntese de O-glicídios (Haslam *et al*, 2001; Corfield, 2014). O processo de O-glicosilação pode ser descrito em três principais etapas:

a) *Adição do resíduo de N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) pela ppGaNTases* (Figura 14-1). Essa etapa também é conhecida como síntese do antígeno Tn (GalNAc-O-Ser/Thr) e garante a ocupação correta do sítio de glicosilação, bem como regula os subsequentes passos de extensão da cadeia do O-glicídio;

b) *Extensão do esqueleto*, que culmina na formação de algumas estruturas, das quais as mais importantes são o Tipo 1: Galβ<sub>1,3</sub>GalNAcα-Ser/Thr-proteína; e Tipo 2: GlcNAcβ<sub>1,6</sub>GalNAcα-Ser/Thr-proteína (Figura 14-2);

c) "Decoração" ou alongamento do glicídio e adição da região terminal ou capa, que pode ser feita de diversas maneiras por diferentes glicosiltransferases. Nessa etapa formados glicídios complexos e é gerada a variação glicoproteica, observada, por exemplo, pelos diferentes tipos de mucinas que já foram caracterizados. Podem ser adicionadas antenas, como as de *N*-glicídios complexos, e modificações terminais como ácido siálico, fosforilação, metilação, entre outras (Figura 14-3) (Haslam *et al.*, 2001; Medeiros *et al.*, 2008; Patsos & Corfield, 2009).

A diversidade estrutural excepcional dos glicídios representa um desafio para a síntese e análise química dessas moléculas e é uma das razões para explicar a menor atenção dada a esse campo, em detrimento aos campos de genômica e proteômica.

### 1.1.3 O papel de glicoconjugados em parasitos

Em 1985, Norden & Strand reportaram que a molécula mais antigênica do parasito *Schistosoma mansoni* era um glicídio que podia se ligar a uma lectina chamada concanavalina A (Norden & Strand, 1985). Desde então diversos pesquisadores passaram a prestar atenção para os papéis desempenhados por glicídios em diferentes tipos de parasitos.

Glicídios são abundantes na superfície de helmintos e protozoários e em seus produtos de secreção/excreção (Cumumings e Nyame 1996; Khoo & Dell 2001; Nyame *et al.*, 2004). Assim como outros animais, parasitos são capazes de produzir *N*- e *O*-glicídios, assim como glicolipídeos, polissacarídeos e glicosaminoglicanos. Apesar do mecanismo base de glicosilação em organismos eucariotos ser bem próximo, a principal diferença é encontrada na estrutura do núcleo de proteínas e glicolipídeos e nas modificações na porção terminal dos glicídios. Diversos glicídios de helmintos contêm porções altamente antigênicas que são formados por monossacarídeos incomuns, ou sequências incomuns de monossacarídeos ou ligações incomuns entre monossacarídeos comuns.

Além disso, diversos helmintos também expressam determinantes glicídicos "hospedeiro-like" (Cumumings, 2009) que, assim como aqueles glicídios de estrutura

incomum, também podem induzir uma resposta anti-glicídica, gerando anticorpos que tem reatividade cruzada com glicídios do hospedeiro. A expressão de glicídios hospedeiro-*like* por parasitos helmintos é generalizada e diferentes tipos desses glicídios são encontrados em diversos parasitos. Alguns exemplos de estruturas terminais de glicídios que são compartilhadas entre parasitos e hospedeiros incluem Lewis X (Le<sup>x</sup>), LDN, LDNF, O-glicídios truncados, conhecidos como antígeno *T* (Gal $\beta$ <sub>1-3</sub>GalNAc $\alpha$ 1-O-Thr/Ser) e antígeno *Tn* (GalNAc-O-Ser/Thr) (van Die & Cummings, 2010). Em contraste aos helmintos, que expressam esses glicídios em abundância, os hospedeiros mamíferos os expressam com restrições, e geralmente os terminais glicídios apresentam uma capa de ácido siálico, um tipo de glicídio que parasitos helmintos raramente expressam (Figura 12).

Em alguns casos os glicídios imunogênicos podem ser restritos a uma ou poucas espécies, o que os torna uma opção para utilização como marcador diagnóstico para casos de infecção. Outros glicídios são altamente compartilhados entre diferentes parasitos helmintos e, às vezes, até mesmo com outros organismos como caramujos e plantas, o que pode acarretar reatividade cruzada em diagnósticos sorológicos (van Die & Cummings, 2006). Glicídios presentes na superfície ou nos produtos de secreção/excreção (ES) de helmintos podem interagir com receptores do tipo Lectina-C (CRL) do hospedeiro e induzir resposta imune e geração de anticorpos antiglicídios que estão presentes no soro de hospedeiros infectados (van Die & Cummings, 2006).

Cada vez mais estudos demonstram que os glicídios, e não as proteínas, são frequentemente os antígenos dominantes para a maioria das infecções parasitárias, incluindo malária, amebíase, tripanossomíase, leishmaniose, esquistossomose, filaríose e angiostrongilíase (Norden & Strand, 1985; Eberl *et al.*, 2001; Cummings & Nyame, 1996, 1999; Hokke & Deelder, 2001; Thomas & Harn Jr, 2004; Morassutti *et al.*, 2012). Carboidratos complexos são importantes também no estabelecimento das infecções parasitárias (Dinglasan *et al.*, 2003; Priest *et al.*, 2003; O'Connor *et al.*, 2003), e seu estudo favorece o entendimento das interações parasito-hospedeiro. O conhecimento dos glicídios implicados nas infecções parasitárias é o primeiro passo para elucidação do papel dessas moléculas durante o processo de infecção e doença.

Ainda não se tem completo conhecimento a respeito das bases moleculares da resposta imunológica a glicídios em hospedeiros ou parasitos, o que limita o desenvolvimento de novos tratamentos e métodos diagnósticos, por exemplo. Alguns helmintos, como os do gênero *Schistosoma*, vivem nos vasos sanguíneos, enquanto outros helmintos, como os cestódeos e os nematódeos vivem no trato gastrointestinal, pele, cérebro ou vasos linfáticos e, apesar dos diferentes locais, possuem a habilidade de sobreviver por longos períodos em seus hospedeiros através da supressão do sistema imune do hospedeiro. Mesmo que o hospedeiro infectado inicialmente desenvolva uma resposta imune inflamatória contra o parasito, a maioria dos parasitos helmintos tem a capacidade de polarizar a resposta imune para um padrão T-helper 2 (*Th2*) e estabelecer uma infecção crônica (Sher *et al.*, 2003).

Células dendríticas (CDs) desenvolvem um importante papel na ativação da resposta imune adaptativa, através da resposta imune inata (Kapsenberg, 2003). O repertório de glicídios incomuns apresentados pelos parasitos helmintos tem sido considerado um potencial mecanismo para modificar o sistema imune do hospedeiro. Estudos recentes demonstram que glicídios incomuns e glicídios hospedeiros-*like* provenientes de parasitos são amplamente reconhecidos por CDs através de seus receptores tipo CRL (Linehan *et al.*, 2003; Van Liempt *et al.*, 2007), podendo levar ao aumento ou diminuição da resposta imunológica às infecções parasitárias (Geijtenbeek *et al.*, 2003; Van Kooyk & Rabinovich 2008; Meyer-Wentrop *et al.*, 2009). As CDs possuem diferentes classes de receptores: receptores *Toll-like* (TLRs) e receptores CLR (Akira *et al.*, 2006; Diebold 2009). Diferentes tipos de CRLs podem estar presentes na superfície das CDs, e o conjunto varia com a população celular. Alguns tipos de CRLs são sabidos interagir com glicídios hospedeiro-*like*, é o caso CRL-SIGN, CRL-MGL e CRL-MR. A tabela 3 resume os principais tipos de receptores tipo CRL e os glicídios pelos quais possuem afinidade.

Conforme os dados da Tabela 3, receptores tipo lectina podem reconhecer uma variedade de antígenos glicídicos, desde os glicídios hospedeiros-*like* até os glicídios característicos de parasitos helmintos. Por exemplo, CD-SING reconhece glicídios ligados a glicídios com estrutura de Lewis X ( $Le^x$ ), LDNF e N-glicídios com alto conteúdo de manose, que ocorrem em diversos parasitos (Tabela 4) e nos

hospedeiros (Okano et al., 2001; Geijtenbeek *et al.*, 2003; Gomez-Garcia *et al.*, 2006). Apesar do mecanismo pelo qual os glicídios derivados de parasitos estão envolvidos na modulação imune através de interações específicas com receptores celulares ainda não ser totalmente conhecido, sabe-se que CDs ligam e internalizam antígenos solúveis derivados de ovos de *S. mansoni* através de receptores MGL, MR e CD-SING, o que leva a CD a induzir uma resposta padrão *Th2* (Van Liempt *et al.*, 2007).

**Tabela 3.** Receptores tipo Lectina-C encontrados em células de defesa humanas

Receptor de Lectina-C em Células Dendríticas humanas	Glicídio reconhecido	Referência
<p><b>CRL-SIGN</b></p> <p>Expresso CDs presents em linfonodos, adenóides, derme e intestino</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Resíduos de fucose ou manose,</li> <li>• Le<sup>x</sup></li> <li>• Le<sup>y</sup></li> <li>• LDNF</li> <li>• N-glicídios com alto conteúdo de manose</li> </ul>	Van Liempt et al., 2006
<p><b>CRL-MGL</b></p> <p>Do inglês <i>Macrophage galactose-type C-type lectin</i>. Expressos em células apresentadoras de antígeno, presentes do intestino, linfonodos e pele.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glicídios contendo terminais com GalNAc <math>\alpha</math>- ou <math>\beta</math>- ligados (p/ ex. LDN)</li> <li>• Antígeno <i>Tn</i></li> </ul>	van Vliet et al., 2005
<p><b>CRL-MR</b></p> <p>Receptor de Manose</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diversos glicídios contendo manose</li> </ul>	Martinez-Pomares et al., 2001

Algumas infecções frequentemente resultam em elevados títulos de IgE, eosinófilos e mastócitos. A esquistossomose em humanos e animais induz uma resposta humoral, levando a geração de diferentes classes de anticorpos (IgM, IgG e IgA), e geralmente os títulos de anticorpos anti-glicídios são diretamente proporcionais a severidade da infecção (Van Dam *et al.*, 1994; Ko *et al.*, 1990; Nyame *et al.*, 2003; van Remoortere *et al.*, 2001). Foi observado que a principal resposta imune gerada nas infecções por espécies de *Schistosoma* é contra

antígenos glicídicos e que a maioria desses antígenos estão presentes na superfície do parasito (Hokke & Deelder, 2001; Nyame *et al.*, 2003).

Entretanto, vermes adultos de *Schistosoma* e outros parasitos são relativamente refratários ao ataque imune em indivíduos infectados (Dixon, 1997), em contraste com outras formas parasitárias do início do ciclo, como as larvas. Isso pode ser explicado pelo fato de que diversos vermes adultos de nematódeos e cestódeos desenvolvem uma cutícula protetora associada à resistência a lise pelo sistema imunológico (Taratuto & Venturiello, 1997). Adicionalmente, sabe-se que alguns anticorpos formados são importantes para a formação da imunidade concomitante, onde o animal se torna relativamente resistente a outras infecções pelo mesmo parasito, no caso do *Schistosoma*, provavelmente porque o esquistossômulo é sensível ao ataque imune de anticorpos anti-glicídicos (Nyame *et al.*, 2003).

Os parasitos helmintos podem desenvolver “*glycan gimmickry*”, sendo essa uma incrível propriedade dos parasitos que pode levar a imunomodulação (van Die & Cummings, 2010). Diferentes espécies de parasitos helmintos, bastante distante filogeneticamente, utilizam da mesma estratégia de sobrevivência em seus respectivos hospedeiros. Esta pode ser uma espécie de mimetismo molecular, onde os parasitos produzem moléculas antigênicas muito próximas às moléculas do hospedeiro, como por exemplo glicídios hospedeiro-*like*, que podem interagir com os receptores presentes nas células do sistema imune como um mecanismo para evadir a resposta do hospedeiro, prolongando assim sua sobrevivência (Colmenares *et al.*, 2004; Cambi *et al.*, 2003; van Kooyk & Geitenbeek, 2003; Brodskyn *et al.*, 2002).

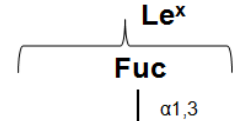

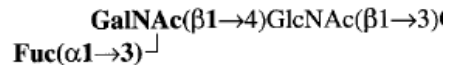
O modo de interação de helmintos e protozoários com células do sistema imune é completamente diferente. A estimulação imune por parte de helmintos é mais exercida por antígenos ES, o que faz com que antígenos glicídios sejam especialmente importantes, visto que glicoconjugados são mais ligados a moléculas secretadas e presentes na superfície de parasitos. Estudos utilizando ES de *Taenia solium*, *Opisthorchis viverrini*, *Schistosoma* e *Echinostoma caproni* demonstraram que, em geral, o tratamento do ES com diferentes glicosidases gera a redução ou

completo desaparecimento da reatividade do antígeno com anticorpos (Haslam *et al.*, 2003; Talabnin *et al.*, 2013; Hokke *et al.*, 2007; Sotillo *et al.*, 2014).

Por outro lado, parasitos protozoários como *Plasmodium* ou *Leishmania*, evitam o contato com a imunidade efetora ao invadir células humanas, assim se tornando crônicas. Já o *Trypanosoma* utiliza suas próprias moléculas para táticas de evasão. Esse parasito consegue viver livremente na circulação sanguínea mesmo produzindo uma âncora de glicofosfatidilinositol (GPI) em sua superfície. Essa molécula, conhecida como glicoproteína variante de superfície (VSG), é altamente imunogênica, mas o *Trypanosoma* pode mudar para um VSG diferente (em termos de sequência de glicídios) a cada poucas semanas (mais de 1000 possíveis variantes já foram identificadas). Assim, uma nova população de *Trypanosoma* imunologicamente diferente é periodicamente gerada. Os novos parasitos evadem a resposta imune já existente, desenvolvida contra um VSG diferente, e esse ciclo se repete com o surgimento de uma nova variação antigênica a cada poucas semanas (Ferguson, 1999).

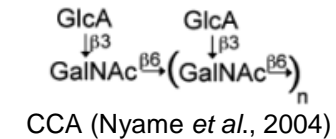
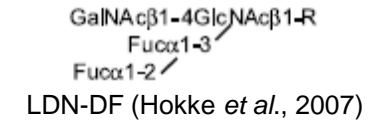
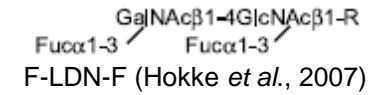
A dificuldade em definir estruturas tão incomuns de glicídios derivados de parasitos, bem como de sintetizar especificamente estes glicídios em quantidades suficientes é o que mais limitou, até poucos anos atrás, a utilização dessas moléculas para testes e avaliações como componentes de novos testes imunológicos e vacinas. Nos últimos anos, entretanto, houve um enorme avanço em termos de desenvolvimento e melhora de métodos para análises de glicídios. Esses métodos incluem ressonância magnética nuclear, espectrometria de massas, *glycan array*, *lectina array* entre outros. A Tabela 5 resume alguns dos principais métodos desenvolvidos e utilizados para análise de glicídios e glicoconjugados.

**Tabela 4.** Principais glicídios e glicoconjugados já descritos em parasitos helmintos e protozoários

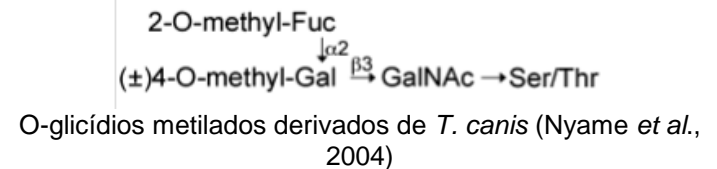
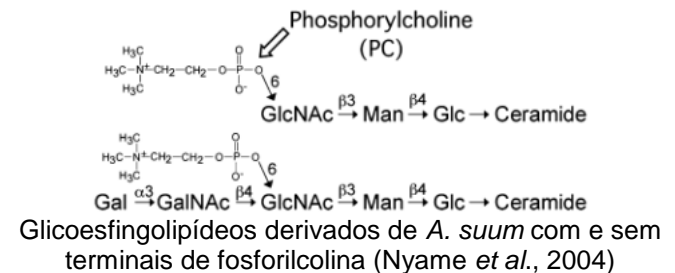
Parasito	Glicídio	Referências	Estruturas glicídicas
<b>Helmintos</b>			
<b>Trematódeos</b>			
<i>Schistosoma sp</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lewis X (Le<sup>x</sup>)</li> <li>Pseudo Le<sup>y</sup></li> <li>LacdiNAc (LDN)</li> <li>LDNF</li> <li>FLDN</li> <li>F-LDN-F</li> <li>LDN-DF</li> <li>DF-LDNF-DF</li> <li>O-glicídios truncados <i>T</i> e <i>Tn</i>,</li> <li>Glicídios com alto conteúdo de manose (Man<sub>5-9</sub>GlcNAc)</li> <li>N-glicídios com resíduos de xylose β<sub>1-2</sub>-ligadas</li> <li>N-glicídios com resíduos de fucose α3-ligados</li> <li>Antígeno catódico contendo ácido glucurônico (CCA)</li> </ul>	<p>Hokke <i>et al.</i>, 2007 Nyame <i>et al.</i>, 2002 Peterson <i>et al.</i>, 2009 Wuhrer <i>et al.</i>, 2006 Cummings &amp; Nyame, 1999 van Die &amp; Cummings, 2006 van Die <i>et al.</i>, 1999 Haslam <i>et al.</i>, 1996 e 1998 Wisnewski <i>et al.</i>, 1993 Bergwerff <i>et al.</i>, 1994</p>	 <p style="text-align: center;"><b>Le<sup>x</sup></b> <b>Fuc</b>   α1,3 <b>Galβ1,4GlcNAc</b></p> <p>Adaptado de: Srivatsan <i>et al.</i>, 1992</p>  <p style="text-align: center;"><b>LDNF</b> Fuc   α1,3 GalNAc β1,4GlcNAc β1,2Man α1,6 GalNAc β1,4GlcNAc β1,2Man α1,3 LDN</p> <p>Adaptado de Srivatsan <i>et al.</i>, 1992</p>  <p style="text-align: center;"><b>GalNAc(β1→4)GlcNAc(β1→3)</b> <b>Fuc(α1→3)</b></p> <p>FLDN (Kantelhsrdt <i>et al.</i>, 2002)</p>
	<i>Fasciola hepática</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>LDN</li> <li>LDNF</li> <li>O-glicídios truncados <i>T</i> e <i>Tn</i></li> <li>Glicoesfingolípideo</li> </ul>	<p>Vervelde <i>et al.</i>, 2003 Freire <i>et al.</i>, 2003 Wuhrer <i>et al.</i>, 2003, 2004</p>



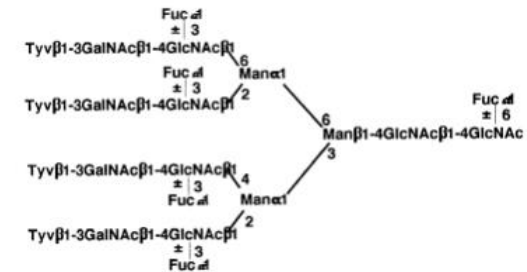
<i>Opisthorchis viverrini</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Man<sub>5-9</sub>GlcNAc, monofucosilados</li> <li>• Glicídios truncados, híbridos e complexos com 1 a 4 antenas</li> <li>• O-glicídios contendo entre 1 e 5 antenas, tipo mucina (Galβ<sub>1-3</sub>GalNAc)</li> </ul>	Talabnin <i>et al.</i> , 2013
<b>Nematódeos</b>		
<i>Ascaris suum</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Man<sub>5-9</sub>GlcNAc</li> <li>• N-glicídios com terminais de fosforilcolina</li> <li>• O-glicídios</li> <li>• Glicosíngolipídeos com terminais de fosforilcolina</li> <li>• Glicosíngolipídeos contendo 3-sulfogalactosilcerebrosídeo</li> </ul>	<p>Poltl <i>et al.</i>, 2007                  Dell <i>et al.</i>, 1999                  Lochnit <i>et al.</i>, 1998</p>
<i>Toxocara canis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O-glicídios truncados <i>T</i> e <i>Tn</i></li> <li>• O-glicídios metilados</li> </ul>	<p>Casaravilla <i>et al.</i>, 2003                  Khoo <i>et al.</i>, 1991</p>
<i>Dictyocaulus viviparus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Man<sub>5-9</sub>GlcNAc</li> <li>• Le<sup>x</sup></li> </ul>	Haslam <i>et al.</i> , 2000
<i>Trichinella spiralis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• LDN e LDNF (com ou sem</li> </ul>	Morelle <i>et al.</i> , 2000



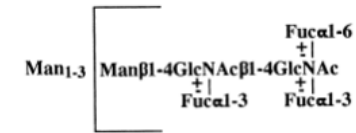
**[GlcNAcα1-HPO3-6Gal(1-1)→ceramida]**  
 Glicosíngolipídeo presente no antígeno de *F. hepática*  
 (Adaptado de: Wuhrer *et al.*, 2003)



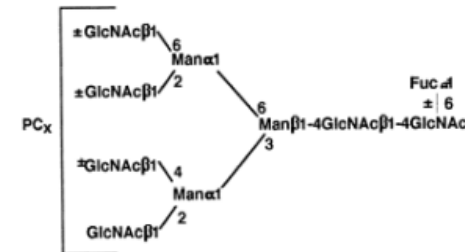
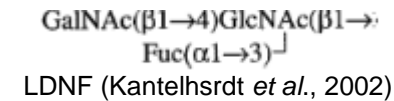
	<ul style="list-style-type: none"> <li>terminais de fosforilcolina)</li> <li>Tyvelose β3-ligada</li> <li>Man<sub>5-9</sub>GlcNAc</li> <li>N-glicídios com resíduos de fucose α3-ligados</li> </ul>	van Die & Cummings, 2006 van Die <i>et al.</i> , 1999 Haslam <i>et al.</i> , 1996, 1998 Wisnewski <i>et al.</i> , 1993
<i>Haemonchus contortus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>LDN</li> <li>LDNF</li> <li>Man<sub>5-9</sub>GlcNAc</li> <li>N-glicídios com resíduos de fucose α3-ligados</li> </ul>	Geldhof <i>et al.</i> , 2005 Haslam <i>et al.</i> , 1996, 1998 van Die & Cummings, 2006 van Die <i>et al.</i> , 1999 Wisnewski <i>et al.</i> , 1993
<i>Dirofilaria immitis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>LDN</li> <li>LDNF</li> </ul>	Nyame <i>et al.</i> , 1998
<i>Wuchereria bancrofti</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>N-glicídios com terminais de fosforilcolina</li> </ul>	Dell <i>et al.</i> , 1999
<i>Onchocerca volvulus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Man<sub>5-9</sub>GlcNAc</li> <li>N-glicídios com terminais de fosforilcolina</li> <li>Glicolipídeos com terminais de fosforilcolina</li> </ul>	Haslam <i>et al.</i> , 1997, 1999 Wuhler <i>et al.</i> , 2000
<i>Onchocerca gibsoni</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Man<sub>5-9</sub>GlcNAc</li> <li>N-glicídios com terminais de fosforilcolina</li> </ul>	Haslam <i>et al.</i> , 1997, 1999
<i>Acanthocheilonem a viteae</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Man<sub>5-9</sub>GlcNAc</li> <li>N-glicídios com terminais de fosforilcolina</li> </ul>	Haslam <i>et al.</i> , 1999
<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>O-glicídios truncados T e Tn</li> </ul>	Casaravilla <i>et al.</i> , 2003



Estrutura do principal antígeno de *T. spiralis* (TSL1), com a presença da capa de tyvelose (Dell *et al.*, 1999)



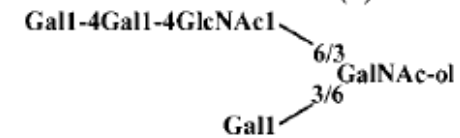
N-glicídios de *H. contortus*, com resíduos de fucose α3-ligados (Dell *et al.*, 1999)



N-glicídios com terminais de fosforilcolina, estrutura comum entre diversos gêneros de filarias (Haslam *et al.*, 1999)

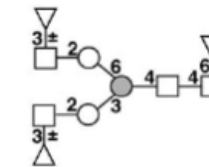
**Cestódeos**

<i>Echinococcus multilocularis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>O-glicídios truncados <i>T</i> e <i>Tn</i></li> <li>Mucina</li> </ul>	Ingold et al., 2000 Hülsmeier et al., 2002
<i>Echinococcus granulosus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>O-glicídios truncados <i>T</i> e <i>Tn</i></li> <li>Man<sub>5-9</sub>GlcNAc</li> <li>Glicídios truncados</li> <li><i>N</i>-glicídios fucosilados com terminais de fosforilcolina</li> <li>Glicosfingolípídeos</li> </ul>	Errico et al., 2001 Alvarez Errico et al., 2001 Khoo et al., 1997 Paschinger et al., 2012 Wuhrer et al., 2004
<i>Mesocestoides vogae</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>O-glicídios truncados <i>T</i> e <i>Tn</i>, <i>Tn</i>-sialilado*</li> </ul>	Medeiros et al., 2008 Van Die & Cummings, 2010
<i>Metacestoides corti</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>O-glicídios truncados <i>T</i> e <i>Tn</i></li> </ul>	Freire et al., 2003
<i>Taenia hydatigena</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>O-glicídios truncados <i>T</i> e <i>Tn</i></li> </ul>	Freire et al., 2003
<i>Taenia crassiceps</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>N</i>-glicídios com resíduos de fucose α3-ligados</li> <li>Man<sub>5-9</sub>GlcNAc</li> <li>Glicolípídeos</li> <li>Glicosfingolípídeos</li> </ul>	Lee et al., 2005 Nyame et al., 2004
<i>Taenia solium</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Man<sub>5-9</sub>GlcNAc</li> <li><i>N</i>-glicídios complexos e truncados, com ou sem fucose</li> <li>Glicolípídeos</li> </ul>	Restrepo et al., 2000 Haslam et al., 2003 Nyame et al., 2004

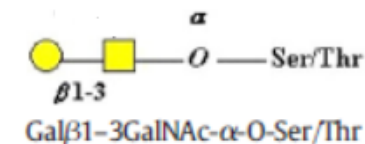


Estrutura do glicídio associado ao antígeno de *E. multilocularis* - Em2 (Hülsmeier et al., 2002)

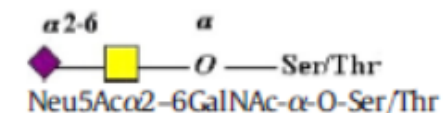
**Gal(β1-6)Gal(β1-6)Gal(α1-4)Gal(β1-4)Glc→Ceramida**  
Glicosfingolípídeo presente em parasitos cestódeos (*E. granulosus* e *T. crassiceps*) Wuhrer et al., 2004



*N*-glicídio com resíduos de fucose α3-ligada, presente em glicídios derivados de diversos parasitos helmintos (Jang Lee et al., 2005)



Estrutura do Antígeno *T* (Corfield, 2014)

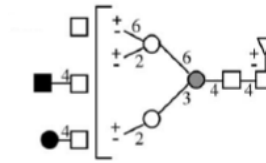


Estrutura do Antígeno *Tn* sialilado (Corfield, 2014)

*Taenia saginata*

- Glicolípídeos

Nyame *et al.*, 2004



Estrutura de *N*-glicídio complexo derivado de *T. solium* (Haslam *et al.*, 2003)



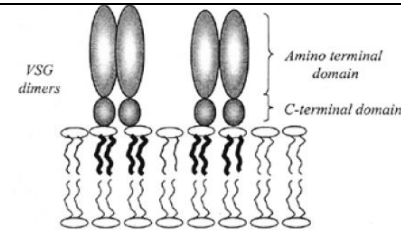
Glicolípídeos comum em *Taenia* de diversas espécies (Nyame *et al.*, 2004)

**Protozoários**

*Trypanosoma* sp

- Âncora de GPI (VSG)
- Prociclinas (PARP)
- O-glicídios com alto conteúdo de galactose - Mucinas
- Lipopeptídeofosfoglicano (LPPG)
- Fosfolípídeos ligados GPI (GIPL)
- Trans-sialidasas\*

Ferguson, 1999  
 Ferguson *et al.*, 1993  
 Todeschini *et al.*, 2001  
 Costa *et al.*, 1998  
 Previato *et al.*, 1990

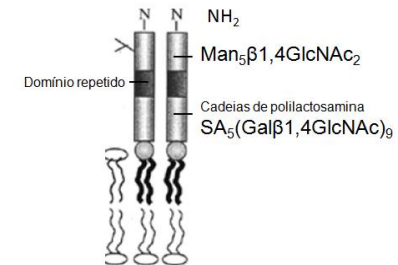


VSG presente na forma metacíclica de *T. brucei*. Cada molécula consiste em monômeros de *N*-glicídios ancorados a GPI (Guha-Niyogi *et al.*, 2001)

*Plasmodium* sp

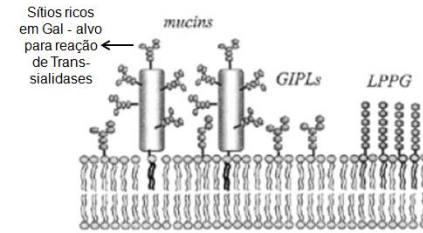
- Âncora de GPI
- *N*- e *O*-glicídios

Gowda & Davidson, 1999  
 Burghaus *et al.*, 1999  
 Khan *et al.*, 1997

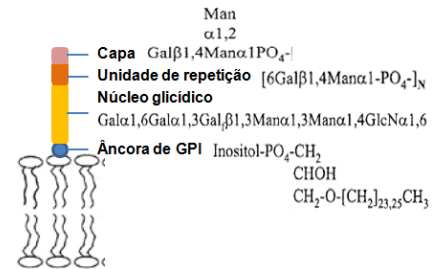


Prociclinas (PARP) presentes na forma procíclica de *T. brucei* (Adaptado de: Guha-Niyogi *et al.*, 2001)

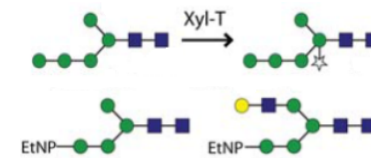
<i>Leishmania sp</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lipofosfoglicanos (LPG)</li> <li>• Fosfolipídeos ligados GPI (GIPL)</li> <li>• Fosfoglicanos</li> <li>• Proteofosfoglicano (PPG)</li> <li>• O-glicídio, tipo mucina</li> </ul>	Descoteaux & Turco, 1999 Ilg <i>et al.</i> , 1995 Guha-Niyogi <i>et al.</i> , 2001
<i>Entamoeba histolytica</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lectina Gal-GalNAc</li> <li>• LPG</li> <li>• LPPG</li> <li>• Glico-conjugados sialisados</li> </ul>	Petri, 1996 Mood-Haupt <i>et al.</i> , 2000 Stanley <i>et al.</i> , 1995
<i>Trichomonas vaginalis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• LPG</li> <li>• Adesinas</li> <li>• N-glicídios com modificações específicas</li> </ul>	Singh <i>et al.</i> , 1999, 2000 Paschinger <i>et al.</i> , 2012b
<i>Giardia</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína variante de superfície</li> <li>• O-glicídios</li> <li>• N-glicídios</li> </ul>	Gillin & Reiner, 1996 Papanastasiou <i>et al.</i> , 1997 Bulik <i>et al.</i> , 2000
<i>Toxoplasma gondii</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O-glicídios</li> <li>• N-glicídios</li> <li>• Âncoras de GPI</li> </ul>	Guha-Niyogi <i>et al.</i> , 2001



Esquema da superfície de *T. cruzi* (Adaptado de: Guha-Niyogi *et al.*, 2001)



Estrutura do LPG presente na superfície de *Leishmania* (Adaptado de: Guha-Niyogi *et al.*, 2001)



N-glicídios modificados por pentose (Xylose) e Fosfoetanolamida presentes em *T. vaginalis* (Paschinger *et al.*, 2012b)

Toda essa tecnologia refletiu na geração de diversas informações a respeito de estruturas de glicídios e glicoconjugados derivados de parasitos (Tabela 4) (Ko *et al.*, 1990; van Remoortere *et al.*, 2001, 2003; Moody-Haupt *et al.*, 2000; Descoteaux & Turco, 1999; Todeschini *et al.*, 2001) e hoje sabemos, por exemplo, que cada tipo de parasito protozoário produz glicídios com estruturas únicas e altamente complexas e que helmintos produzem glicídios com estruturas truncadas, complexas e híbridas que são abundantes em diversos gêneros de parasitos sendo a fucosilação a modificação mais comum observada nessas moléculas.

**Tabela 5.** Principais métodos aplicados para análise de glicídios e glicoconjugados. (Adaptado de: Solis *et al.*, 2015)

<b>Método</b>	<b>Aplicação</b>
<b>Técnicas computacionais</b>	Predição e modelagem da estrutura molecular de monossacarídeos, glicídios complexos e receptor-ligante. Estimativa de interação entre moléculas. Exploram a estrutura molecular do glicídio, a dinâmica e os mecanismos de reconhecimento.
<b>Cristalografia de Raio-X</b>	A difração das moléculas fornece um padrão que é como uma impressão digital da molécula em relação ao arranjo dos átomos no cristal. A difração de um cristal susceptível gera um mapa de elétrons que torna possível determinar a estrutura tridimensional da molécula ou de um complexo lectina-ligante, por exemplo. A cristalografia pode requerer condições não fisiológicas da molécula.
<b>Espectrometria de massas</b>	Ionização por eletrospray (ESI) e Ionização por dissorção a laser em matriz assistida (MALDI) são as mais utilizadas. Elucidação da massa de biomoléculas, detecção de mutantes e modificações pós-traducionais.
<b>Transferência de energia por ressonância de fluorescência</b>	Método muito sensível que mensura a distância entre dois fluoróforos. A técnica permite a investigação de uma variedade de fenômenos biológicos que culminam em mudança da proximidade molecular. Pode-se verificar a distância entre dois diferentes domínios em uma mesma proteína, obtendo-se assim informação em relação a estrutura e presença de sítios glicosilados por <i>N</i> -glicídios. Também é possível determinar diferentes interações entre proteínas e estruturas celulares, ligantes e membranas.
<b>Cromatografia</b>	<b>Gel filtração:</b> Determinação da massa molecular aparente, comportamento hidro-dinâmico da proteína e o grau de pureza. <b>Afinidade:</b> Purificação de misturas complexas. Permite determinar padrões de interação de moléculas. Podem também ser obtidas informações quantitativas a respeito da constante de associação.
<b>Ressonância magnética nuclear (RMN)</b>	Técnica muito sensível para determinar estruturas de proteínas e glicídios. Pode-se resolver a constituição, a conformação, a dinâmica e as pequenas modificações e interações de moléculas de variados tamanhos, tanto em solução quanto em estado sólido. Fornece a estrutura tridimensional. <b>RMN-STD – Transferência por diferença de saturação:</b>

	Permite o monitoramento da associação de um ligante particular ou mistura de ligantes a um receptor. Assim é possível determinar o epítipo que liga e permanece em contato com o receptor.
<b>Microscopia de força atômica (MFA)</b>	Permite a determinação da estrutura tridimensional de uma molécula em um ambiente fisiológico. Monitoramento em tempo real de processos bioquímicos e fisiológicos em uma alta resolução. É possível também investigar interações moleculares.
<b>Mapeamento químico</b>	Delineamento da estrutura topológica de interação lectina-ligante. Muito utilizada na análise comparativa e designer de inibidores seletivos para um membro particular de uma família de lectinas.
<b>Hemaglutinação</b>	Ensaio clássico utilizado para verificação da atividade de lectinas em uma amostra. Pode-se também determinar o potencial inibidor de diferentes sacarídeos
<b>Eletroforese por afinidade a lectinas</b>	A redução da mobilidade de glicoproteínas no gel evidencia a interação com lectinas, o que tanto determina a afinidade quanto a presença de diferentes glicofomas. Permite a detecção, análise estrutural e semi-quantificação de glico-conjugados presentes em uma amostra complexa.
<b>Blots utilizando lectinas</b>	Permite a caracterização de diferentes glico-conjugados imobilizados em uma membrana. Pode-se monitorar a presença de diferentes padrões de glicosilação em diferentes amostras.
<b>Microarrays</b>	Glico e Lectina Array. Detecção e quantificação de um “alvo” marcado, usualmente com moléculas fluorescentes. As informações geradas dependem do sistema, lectinas ou glicídios utilizados no método. Fornece a descrição do perfil glicídico da amostra e informação a respeito da especificidade das interações.
<b>Análise por precipitação</b>	A precipitação evidencia a associação do açúcar com o ligante. Pode-se determinar a ligação de açúcar a ligantes específicos e a reatividade cruzada.
<b>Quantum dots (QDs)</b>	Nanotecnologia de cristais que adsorvem luz e então reemitem a mesma. Constituem uma plataforma física de biossensores e bioprobes. Pode-se detectar a interação proteína-ligantes com QDs funcionalizados. Técnica com alta sensibilidade que pode ser utilizada para obtenção de informações em células vivas.
<b>Ressonância de plasma de superfície (SPR, em inglês)</b>	Chips especialmente desenvolvidos permitem a determinação da associação e da constante cinética de associação entre ligante-receptor. Pode-se realizar estudos de interações biomoleculares de componentes não marcados e em tempo real.
<b>Scaneamento celular por fluorescência ativada (FACScan)</b>	Análise do conteúdo de DNA/RNA, eventos intracelulares e dinâmica de membrana. Caracterização da presença de glico-conjugados e lectinas, e diferenças do perfil de acordo com a diferenciação celular, por exemplo.
<b>Cito e histoquímica com lectinas</b>	Localização de glicídios e ou lectinas em sítios específicos. Análises de glicofenótipos de acordo com mudanças de estágio, patologias ou tipo celular.
<b>Biodistribuição (<i>in vivo</i>)</b>	Análise da distribuição, excreção e absorção de glico-conjugados por um organismo.
<b>Designer de mutantes (lectinas, glicogenes, modelos animais)</b>	Avaliação da importância fisiológica e biológica de determinada molécula ou gene pela comparação do controle com o modelo mutante.
<b>Engenharia de glicídios</b>	Estudo de vias de glicosilação, secreção e rota para apresentação de glicídios na superfície em diferentes modelos celulares.
<b>Oxidação de</b>	Oxidação de carboidratos pelo meta-periodato permite uma rápida e eficiente avaliação da presença de glicídios e da

<b>carboidratos</b>	importância dos mesmos para interação de determinada molécula com receptores ou anticorpos.
<b>Métodos para coloração de glicídios</b>	Utilizado em géis de SDS-PAGE ou membranas apropriadas. Os métodos são derivados da capacidade do corante fucsina se ligar a glicídios previamente oxidados. Perfil glicídico de amostras complexas, comparação entre amostra, avaliação de susceptibilidade a deglicosilação por enzimas específicas.
<b>Glicosidases</b>	A produção de proteínas recombinantes favoreceu a comercialização de glicosidases com diferentes especificidades. Permitem a caracterização da estrutura de glicídios associados a glicoproteínas ou glicolipídeos pela remoção específica de glicídios e manutenção da estrutura proteica ou lipídica intacta.

### 1.1.3.1 Glicoconjugados descritos em protozoários

#### Trypanosoma

O protozoário *Trypanosoma* gera uma âncora de glicofosfatidilinositol (GPI) ligada a lipídios, que contem modificações espécie-específica e que são sintetizadas em um passo único, diferindo das GPIs encontradas em mamíferos (Ferguson, 1999). Novos tratamentos baseados nessa informação tem sido desenvolvidos, um deles é a tentativa de inibição enzimática do passo único para biossíntese da âncora de GPI (Ferguson, 1999). Além disso, virtualmente todos os protozoários sintetizam âncoras de GPI.

O *T. cruzi* também sintetiza O-glicídios, mucinas, associados à âncora de GPI. Essa é uma estrutura bastante incomum que está ligada através de uma O-GlcNAc e são dominadas por estruturas contendo galactose, em contraste com o que se observa em mamíferos, onde O-glicídios são ligados por O-GalNAc e contem níveis consideráveis de GlcNAc e resíduos de galactose, além de outros glicídios (Todeschini *et al.*, 2001).

Além disso, *T. cruzi* não sintetiza ácido siálico, mas expressa trans-sialidases que catalisam a transferência de ácido siálico de glico-conjugados do hospedeiro para a superfície do parasito. Essas trans-sialidases podem ser o principal fator de virulência do parasito e essencial para o sucesso da infecção (Costa *et al.*, 1998). Recentes estudos usando formas recombinantes de uma trans-sialidase como



vacina demonstrou 60% de efeito protetor em ratos A/Sn (Pereira-Chioccola *et al.*, 1999).

### Plasmodium

Dentre os protozoários do gênero *Plasmodium* a espécie *P. falciparum* é a mais patogênica. As infecções por este parasito resultam em severas patologias com mecanismos ainda não totalmente compreendidos. Foi demonstrado que o *Plasmodium* pode sintetizar uma âncora de GPI que está associada a mais de 90% dos glico-conjugados do parasito (Gowda & Davidson, 1999). Essas âncoras parecem ser o principal antígeno produzido pelo protozoário e são responsáveis por diversas das severas condições associadas à doença (Schofield *et al.*, 1999; Clark & schofield, 2000).

A âncora de GPI pode ativar macrófagos e células do endotélio vascular através da ativação de diversas vias de sinalização, resultando na produção de mediadores químicos como óxido nítrico (ON), fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ) e moléculas de adesão intracelular I (ICAM-I) fazendo com que esse antígeno seja amplamente estudado como um novo alvo para produção de vacinas (Schofield *et al.*, 2002).

Ratos imunizados com moléculas de âncora de GPI sintéticas geraram altos títulos de anticorpos IgG. Esses anticorpos neutralizaram os efeitos pró-inflamatórios provocados pelos macrófagos, resultando em significativa proteção e neutralização da toxicidade, observada após o desafio com *P. berghei* ANKA, apesar de os animais não terem apresentado redução da parasitemia. Esses resultados sugerem que a âncora de GPI possui uma estrutura conservada entre as diferentes espécies de *Plasmodium* (Schofield *et al.*, 2002).

### Leishmania

A *Leishmania* tem seus glicoconjugados bastante estudados. Esse parasito gera uma superfície de lipofosfoglicanos (LPG) com manoses diferentemente ligadas e modificações incomuns em seu esqueleto. A superfície do parasito ainda pode

conter fosfolipídeos e glicoproteínas ancoradas a GPI e um tipo de mucina de membrana (Descoteaux & Turco, 1999; Guha-Niyogi *et al.*, 2001). As diferentes espécies de *Leishmania* diferem exatamente no tipo de modificação do LPG e no número de unidades de repetição (Guha-Niyogi *et al.*, 2001).

Esse LPG não é altamente imunogênico em infecções naturais (Goel *et al.*, 1999), e pode, em parte, prevenir a lise mediada pelo complemento por bloquear a ligação do complexo de ataque à membrana C5b-9 a membrana das formas promastigotas (Descoteaux & Turco, 1999). Entretanto, ratos vacinados com preparações derivadas de LPG desenvolveram uma imunidade protetora para infecção (Russell & Alexander, 1988), sendo observados anticorpos anti-LPG. Os parasitos expostos a esses anticorpos deram origem a formas incapazes de infectar flebotomíneos, o que sugere um potencial uso dessa molécula para gerar vacina capaz de bloquear a transmissão da *Leishmania* (Tonui *et al.*, 2001).

#### 1.1.3.2 Glicoconjugados descritos em helmintos

Em relação aos glicídios em parasitos helmintos, diversos *N*- e *O*-glicídios associados a proteínas ou lipídeos já foram descritos. Muitas vezes são observadas modificações únicas para o gênero ou espécie, como no caso de parasitos do gênero *Toxocara* que apresentam glicídios *O*-metilados, e outras vezes essas estruturas são compartilhadas entre diferentes gêneros de parasitos e até mesmo outros invertebrados. Por exemplo, *T. spiralis*, assim como *Haeminchus contortus* e espécies do gênero *Schistosoma* sintetizam *N*-glicídios com resíduos de fucose  $\alpha$ 3-ligados (Cummingus & Nyame, 1996; van Die *et al.*, 1999; Haslam *et al.*, 1996, 1998; Wisnewski *et al.*, 1993), uma modificação compartilhada entre invertebrados e plantas (Haslam *et al.*, 2003). Alguns parasitos podem apresentar glicídios estágio-específico ou mesmo determinados glicídios podem estar em diferentes quantidades relativa, de acordo com o estágio de vida do parasito, como demonstrado ocorrer em metacercárias e vermes adultos do parasito hepático, *Opisthorchis viverrini* (Talabnin *et al.*, 2013).

### Trichinella spiralis

*T. spiralis* é o agente causador da triquinose, infecção que pode ocorrer em praticamente todos os mamíferos. Glicoproteínas denominadas TSL-1 são encontradas na cutícula de larvas de *T. spiralis*. Os glicídios presentes nessas glicoproteínas possuem um terminal incomum composto de tyvelose (3,6-didioxi-D-arobino-hexose – Tyv), que só foi descrito antes no lipopolissacarídeo de algumas bactérias gram-negativas. A maioria da tyvelose presente no antígeno TSL-1 está ligada a *N*-glicídios contendo três ou quatro antenas compostas de LDNF que terminam com uma capa de resíduos tyvelose  $\beta$ 3-ligados (Reason *et al.*, 1994).

O processo de infecção da *T. spiralis* e, principalmente, a re-diferenciação das larvas em células do músculo estriado é bastante interessante e alguns autores questionam a participação de glicoconjugados presentes na superfície e ES das larvas nesses eventos. Estudos demonstram que anticorpos monoclonais se ligam a tyvelose sintética conjugada a albumina bovina e provocam a expulsão das larvas infectivas em experimentos com ratos, indicando um grande potencial para uso desse glicídio na prevenção e diagnóstico da parasitose (Elis *et al.*, 1997).

Em geral, os *N*-glicídios em *T. spiralis* possuem múltiplas antenas contendo LDN associado à fosforilcolina, que pode estar ligada ao resíduo de GlcNAc ou GalNAc na molécula de LDN (Morelle *et al.*, 2000). Glicoproteínas e glicolípídeos modificados pela adição de um terminal de fosforilcolina já foram identificados em diversos parasitos helmintos, além de *T. spiralis* (Tabela 4) e estão amplamente envolvidos em atividades de imunomodulação (Paschinger *et al.*, 2006; Poltl *et al.*, 2007). Em antígenos de filarias como *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Onchocerca volvulus* e *Achanthocheilonema viteae* a adição da fosforilcolina é comumente encontrada em glicídios secretados e é fortemente responsável pela reatividade cruzada entre esses parasitos observada em testes imunológicos (Dell *et al.*, 1999).

### H. contortus

*H. contortus* é um parasito nematódeo de carneiros e cabras, que expressa uma grande variedade de glicídios antigênicos, tais como LDN, LDNF e *N*-glicídios com fucose  $\alpha$ 3-ligada, a maioria presente no antígeno ES. A imunização de cabras com glicoproteínas derivadas de antígeno de ES de *H. contortus* promoveu certo grau de proteção contra o parasito (Jasmer & McGuire, 1991; Jasmer *et al.*, 1993). Cordeiros imunizados com esse antígeno apresentaram 89% menos ovos do parasito e carga parasitária 54% menor que o grupo controle. O antígeno ES induziu uma resposta humoral grande, gerando anticorpos IgG, IgA e IgE. Em todos os grupos vacinados os anticorpos gerados foram contra epítomos glicídicos (Vervelde *et al.*, 2003).

### Gênero *Echinococcus*

A análise da delicada camada fibrilar que circunda as larvas de *E. multilocularis* e permanece em constante contato com o hospedeiro demonstrou que esta é composta por grandes quantidades de *O*-glicídios truncados, conhecidos como antígenos *T* e *Tn*, sugerindo um importante papel desses glicídios na interação parasito-hospedeiro (Ingold *et al.*, 2000; Hülsmeier *et al.*, 2002). Esses glicídios são estruturas *O*-glicídicas tipo-mucina, produzidas por diversos parasitos helmintos (tabela 4). Parasitos são conhecidos por expressarem estruturas glicídicas diferenciadas daquelas encontradas nos seres humanos, um exemplo disso é o antígeno *Tk* encontrado em alguns cestódeos (Tabela 4), um tipo de *O*-glicídio anormal associado a células cancerígenas, e por isso considerado um alvo promissor para imunoterapia de alguns tumores (Gakibuc & Gin, 2007).

O antígeno *Tn*, assim como as enzimas envolvidas em sua síntese, já foram reportados também em *E. granulosus* (Alvarez-Errico *et al.*, 2001). Em pacientes com cisto hidático causado pelo *E. granulosus* altos níveis de antígeno *Tn* foram identificados em amostras sorológicas (Alvarez-Errico *et al.*, 2001). Em *Mesocestoides vogae* foi reportada a presença tanto do antígeno *Tn* quanto do antígeno *Tn*-sialilado (NeuAc $\alpha$ <sub>2-6</sub>GalNAc $\alpha$ 1-O-Thr/Ser) (Medeiros *et al.*, 2008). Apesar de esse resultado ter sido obtido a partir de vermes mantidos em cultivo *in vitro*, a presença de ácido siálico deve ser confirmada por outros métodos de

análise, pois se sabe que parasitos helmintos não são conhecidos por expressar glicídios sialilados (van Die & Cummings, 2010).

A análise dos glicídios presentes em um dos principais antígenos de *E. granulosus*, Ag5, revelou a presença de *N*-glicídios com pelo menos duas antenas com fucose  $\alpha_{1-6}$  ligadas, cujas estruturas eram modificadas pela adição de fosforilcolina (Paschinger *et al.*, 2012).

Quanto aos demais *N*-glicídios presentes em cestódeos, sabe-se que o cisto hidático de *E. granulosus* contém uma pequena porção de *N*-glicídios com alto conteúdo de manose e núcleos com estruturas truncadas contendo dois e três resíduos de manose (Khoo *et al.*, 1997). Haslam *et al.* (2003) demonstrou a presença de *N*-glicídios com essas mesmas características presentes em glicoproteínas secretadas por *Taenia solium*, e terminais de *N*-glicídios contendo fucose  $\alpha_{1-3}$  ligada foram identificados em antígenos de *T. crassiceps* (Jang-Lee *et al.*, 2005).

### Gênero *Schistosoma*

Entre os helmintos esse é o gênero que tem seus glicídios mais intensamente estudados. Parasitos do gênero *Schistosoma* sintetizam diversos glicídios antigênicos, incluindo  $Le^x$ , poli  $Le^x$ , LacdiNAc (LDN), LDN fucosilado (LDNF, LDN-diF e FLDN), núcleos com xilose  $\beta_2$ -ligada, *N*-glicídios com resíduos de fucose  $\alpha_3$ -ligados e antígeno catódico contendo ácido glucurônico (CCA).

O antígeno solúvel de ovos de *S. mansoni* e *S. japonicum* (ASO) contém uma grande diversidade de glicoproteínas. O ASO é rico em glicídios que são altamente imunogênicos para animais infectados. Apesar de não se conhecer completamente a composição do ASO, sabe-se que este antígeno possui *N*-glicídios e *O*-glicídios com modificações bastante similares, podendo estar presentes terminais multifucosilados contendo fucose  $\alpha_{1,3}$  e  $\alpha_{1,6}$  ligadas, além de núcleos contendo xilose, LDN, LDNF e  $Le^x$ . (Khoo *et al.*, 1997; Nyame *et al.*, 2002).

Estudos utilizando chimpanzés exploraram a relação entre resposta anti-glicídica e imunização utilizando cercárias de *S. mansoni* atenuadas por radiação

(van Remoortere *et al.*, 2003b; Eberl *et al.*, 2001b). Foi observado que apesar da infecção ocorrer, os vermes adultos eram sexualmente incapacitados e as fêmeas não faziam ovoposição. Quando os chimpanzés foram expostos repetidamente às cercárias atenuadas, anticorpos específicos, IgM e IgG, foram formados, e esses eram primariamente contra antígenos glicídios liberados pela cercária. Alguns epítomos glicídicos reconhecidos pelo soro de chimpanzés vacinados incluem LDN, LDNF, Le<sup>x</sup>, F-LDN e LND-diF (Eberl *et al.*, 2001; van Remoortere *et al.*, 2003b). Somado a isso, diversas proteínas conjugadas com glicídios, como albumina bovina (BSA) conjugada com LDN, LDNF, Le<sup>x</sup> e CCA tem sido preparadas em pequenas quantidades para analisar a resposta imune em animais e humanos infectados (Nyame *et al.*, 2003; Vermeer *et al.*, 2003), o que pode implicar em desenvolvimento de melhores alternativas para o diagnóstico no futuro.

Glicídios contendo Le<sup>x</sup> são encontrados principalmente no gênero *Schistosoma*. O *S. mansoni* expressa Le<sup>x</sup> durante todas as fases do seu ciclo de vida (Nyame *et al.*, 1998), estando associado tanto a glicoproteínas quanto a glicolipídeos presentes na superfície de qualquer que seja o estágio de vida do parasito, ou nos seus produtos de excreção/secreção, inclusive no ASO, porém em diferentes quantidades e locais. Nas larvas associadas ao molusco (hospedeiro intermediário do *Schistosoma*), miracídeo e cercária, o Le<sup>x</sup> é encontrado em pequenas quantidades (Nyame *et al.*, 2002), sendo que experimentos de imunolocalização demonstraram que esse glicídio está restrito a ventosa oral de cercárias (van Remmoortere *et al.*, 2000). Após a cercária penetrar no hospedeiro definitivo e se transformar em esquistossômulo o Le<sup>x</sup> é observado em toda a superfície da larva (Nyame *et al.*, 2003), o que sugere um papel importante desse glicídio no processo de infecção do hospedeiro definitivo.

A maioria dos invertebrados, incluindo os helmintos, expressam estruturas glicídicas com um núcleo LDN, que pode ser convertido a LDNF quando sofre fucosilação (Van Den Eijnden *et al.*, 1998). Glicídios contendo essas estruturas ocorrem comumente entre os parasitos helmintos (Tabela 4). No gênero *Schistosoma*, LDN e LDNF estão presentes em altas quantidades em diferentes estágios, juntamente com o Le<sup>x</sup> (Hokke *et al.*, 2007). Porém, ao contrário do Le<sup>x</sup>,

LDN e LDNF estão presentes em altas quantidades também nas fases iniciais do ciclo de vida do *Schistosoma* (Nyame *et al.*, 2002; Peterson *et al.*, 2009).

No gênero *Schistosoma* o LDN e LDNF são geralmente utilizados como base para a produção de glicídios mais complexos, com estruturas multifucosiladas que são altamente imunogênicas. Esses glicídios são encontrados em glicoproteínas e glicolipídeos derivados dos ovos e das cercárias e possuem estruturas como: LDN-DF (GalNAc $\beta$ <sub>1-4</sub>[Fuc $\alpha$ <sub>1-2</sub>Fuc $\alpha$ <sub>1-3</sub>]GlcNAc-) ou F-LDNF-DF (Fuc $\alpha$ <sub>1-3</sub> GalNAc $\beta$ <sub>1-4</sub>[Fuc $\alpha$ <sub>1-2</sub>Fuc $\alpha$ <sub>1-3</sub>]GlcNAc-) (Khoo *et al.*, 1995; Jang-Lee *et al.*, 2007). Também podem ser observadas repetições múltiplas de LDN e LDNF em *N*-glicídios de *Schistosoma* (Wuhrer *et al.*, 2006).

Em mamíferos, o processo de *N*-glicosilação geralmente resulta em glicídios do tipo complexos e a geração de *N*-glicídios com alto conteúdo de manose em glicoproteínas maduras é limitada e incomum, ocorrendo somente em específicos sítios de glicosilação de proteínas totalmente dobradas que perdem a acessibilidade para o processamento enzimático que ocorre no Retículo Endoplasmático e Complexo de Golgi. Entretanto, na maioria dos helmintos, glicídios imaturos são frequentemente encontrados. No gênero *Schistosoma*, esses glicídios já foram relatados em glicoproteínas derivadas de ovos e vermes adultos das espécies de *S. mansoni* e *S. japonicum* (Cummings & Nyame, 1999).

Adicionalmente, *N*-glicídios que ocorrem no gênero *Schistosoma* geralmente contêm resíduos de oligomanose truncados que podem ocorrer com algumas modificações incomuns, principalmente resíduos de fucose  $\alpha$ <sub>1-3</sub> ligados ou xylose  $\beta$ <sub>1-2</sub> ligados, similar ao que se observa em glicoproteínas derivadas de plantas e insetos (van Die *et al.*, 1999; van Die & Cummings, 2006).

A maioria das modificações descritas anteriormente ocorre tanto em *N*-glicídios quanto em *O*-glicídios associados a proteínas ou lipídeos de *Schistosoma*. Em relação especificamente aos *O*-glicídios, parasitos do gênero *Schistosoma* também podem apresentar *O*-glicídios truncados, tipo *T* e *Tn* (Kantelhardt *et al.*, 2002; Cummings & Nyame, 1999).

### Angiostrongylus

Em relação a glicoconjugados em parasitos do gênero *Angiostrongylus*, existem poucas informações na literatura. Jagdele & Grewal (2003) relataram que a capacidade de adaptação de *Angiostrongylus* a diferentes hospedeiros, principalmente com relação às diferenças de temperatura, que podem variar de 36-38 °C a 20-28 °C no hospedeiro mamífero e moluscos, respectivamente, poderia ser devido a presença de um glicídio, a trealose (Behm, 1997). O acúmulo deste açúcar poderia promover a termotolerância em nematódeos. Somado isso, mais recentemente Morassutti *et al.* (2012), demonstrou que os glicídios estão complementemente envolvidos no reconhecimento imunológico do principal antígeno utilizado para diagnóstico imunológico da parasitose, o antígeno de 31 kDa, e que diferentes modelos de células procarióticas e eucarióticas utilizadas na tentativa de produção recombinante deste antígeno não foram capazes de reproduzir esses glicídios adequadamente, já que a antigenicidade das glicoproteínas não foi obtida.



## 1.2 Justificativa

O antígeno de 31-kDa vem sendo considerado o principal antígeno para o diagnóstico da angiostrongilíase cerebral (Nuamtanong, 1996; Eamsobhana *et al.*, 2001; 2009; Graeff-Teixeira *et al.*, 2009). Entretanto, a obtenção do antígeno é limitada e dispendiosa, uma vez que a produção dos antígenos inclui múltiplas etapas, desde a infecção e manutenção de animais de experimentação, hospedeiros intermediários e definitivos, até a purificação e processamento dos antígenos, fato que torna difícil a pesquisa de validação deste antígeno para o diagnóstico das angiostrongilíases.

No intuito de produzir o antígeno de forma recombinante foi realizada a caracterização proteica do antígeno 31-kDa (Morassuti *et al.*, 2012), que foi identificado como glicoproteína(s), cujo(s) resíduo(s) glicídico(s) é fundamental para o reconhecimento pelos anticorpos no diagnóstico das angiostrongilíases. Nesse sentido, diversos estudos demonstraram que a principal interface entre o parasito e hospedeiro é a superfície do parasito, que na maioria das espécies é recoberta por carboidratos. Adicionalmente, os parasitos são capazes de secretar / excretar glicoconjugados antigênicos que podem se dissipar pelo ambiente que circunda o parasito. Assim, glicoconjugados representam o principal desafio imunogênico para o hospedeiro e podem ser determinantes no estabelecimento das infecções parasitárias. Esses epítomos tanto podem fornecer especificidade antigênica, quanto serem responsáveis pela reatividade cruzada observada em testes imunológicos.

Desta maneira, o estudo dos glicídios associados ao componente de 31-kDa e outros glicídios produzidos pelo parasito é fundamental e poderá favorecer a identificação de novos alvos antigênicos, o desenvolvimento de testes imunológicos, o entendimento mais aprofundado da relação parasito-hospedeiro e a participação dessas moléculas no processo de infecção.

Além disso, a caracterização dos glicídios e identificação das sequências que compõem a fração antigênica do extrato de *Angiostrongylus* abre perspectivas de produção destes resíduos de forma sintética. O que proporcionará maior facilidade e acurácia na produção dos antígenos diagnósticos.

## 1.3 Objetivo

### 1.3.1 *Objetivo Geral*

Estudar o perfil glicídico de *Angiostrongylus cantonensis* e o papel no imunodiagnóstico.

### 1.3.2 *Objetivos Específicos*

- Estudar o repertório de glicídios e glicoconjugados em extratos totais (ET) e produtos de excreção e secreção (ES) de *A. cantonensis*;
- Identificar a composição dos resíduos de glicídios de ET e de ES;
- Caracterizar o tipo de glicídio envolvido no reconhecimento imunológico do antígeno de 31-kDa de *A. cantonensis*;
- Avaliar a composição e estrutura dos glicídios presentes no antígeno de 31 kDa;

## 2 CAPÍTULO 2

### 2.1 Artigo aceito para publicação: Characterization of the N-glycans of female *Angiostrongylus cantonensis* worms

**EP (ELS)** <[ees.ep.0.36d1c8.1f136249@eesmail.elsevier.com](mailto:ees.ep.0.36d1c8.1f136249@eesmail.elsevier.com)>

Para

[caroldmv@yahoo.com.br](mailto:caroldmv@yahoo.com.br) [caroldmv@gmail.com](mailto:caroldmv@gmail.com)

Jan 23 em 9:14 AM

Ms. No.: EP-15-257

Title: Characterization of the N-glycans of female *Angiostrongylus cantonensis* worms

Corresponding Author: Ms. Carolina De Marco Veríssimo

Authors: Alessandra Loureiro Morassutti, PhD; Mark von Itzstein, PhD; Grigorij Sutov; Lauren Hartley-Tassell, PhD; Sarah McAtamney, PhD; Anne Dell, PhD; Stuart M. Haslam, PhD; Carlos Graeff-Teixeira, PhD

Dear Dr. De Marco Veríssimo,

Thank you for submitting your manuscript to Experimental Parasitology. Your manuscript, referenced above, has been reviewed and we invite you to revise and resubmit the manuscript along the lines suggested for further consideration in Experimental Parasitology. The reviewers' comments are below.

Please submit your revision online within 90 days by logging onto the Elsevier Editorial System for Experimental Parasitology. I would appreciate if you could submit your revised paper by Apr 22, 2016.

<http://ees.elsevier.com/ep/>

Your username is: [caroldmv@yahoo.com.br](mailto:caroldmv@yahoo.com.br)

If you cannot remember your password, please click the "Send Username/Password" link on the login page.

NOTE: Upon submitting your revised manuscript, please upload the source files for your article. For additional details regarding acceptable file formats, please refer to the Guide for Authors at: <http://www.elsevier.com/journals/experimental-parasitology/0014-4894/guide-for-authors>

When submitting your revised paper, we ask that you include the following items:

Manuscript and Figure Source Files (mandatory)

We cannot accommodate PDF manuscript files for production purposes. We also ask that when

submitting your revision you follow the journal formatting guidelines. Figures and tables may be embedded within the source file for the submission as long as they are of sufficient resolution for Production. For any figure that cannot be embedded within the source file (such as \*.PSD Photoshop files), the original figure needs to be uploaded separately. Refer to the Guide for Authors for additional information.

<http://www.elsevier.com/journals/experimental-parasitology/0014-4894/guide-for-authors>

#### Highlights (mandatory)

Highlights consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See the following website for more information

<http://www.elsevier.com/highlights>

#### Graphical Abstract (mandatory)

Graphical Abstracts should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Refer to the following website for more information: <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts>

You can find the manuscript record listed under "Submissions Needing Revisions." Click "Revise" when you are ready to submit your revision.

When submitting your revised paper, please a separate document uploaded as "Response to Reviews" that carefully addresses the issues raised in the below comments, point by point. You should also include a suitable rebuttal to any specific request for change that you have not made.

To facilitate the electronic publication of your manuscript (should it be accepted), we request that your manuscript text, tables and figure legend be submitted in an editable format (Word, WordPerfect, or LaTeX only), and all figures uploaded individually as TIF or EPS files.

Please note that this journal offers a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown next to published articles on ScienceDirect (see also <http://www.elsevier.com/audioslides>). If your paper is accepted for publication, you will automatically receive an invitation to create an AudioSlides presentation.

#### Data in Brief (optional)

We invite you to convert your supplementary data (or a part of it) into a Data in Brief article. Data in Brief articles are descriptions of the data and associated metadata which are normally buried in supplementary material. They are actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and freely available to all upon publication. Data in Brief should be uploaded with your revised manuscript directly to Experimental Parasitology. If your Experimental Parasitology research article is accepted, your Data in Brief article will automatically be transferred over to our new, fully Open Access journal,

Data in Brief, where it will be editorially reviewed and published as a separate data article upon acceptance. The 2015 Open Access fee for a Data in Brief is only \$250.

Please just fill in the template found

here:[http://www.elsevier.com/inca/publications/misc/dib\\_data%20article%20template\\_for%20other%20journals.docx](http://www.elsevier.com/inca/publications/misc/dib_data%20article%20template_for%20other%20journals.docx). Then, place all Data in Brief files (whichever supplementary files you would like to include as well as your completed Data in Brief template) into a .zip file and upload this as a Data in Brief item alongside your Experimental Parasitology revised manuscript. Note that only this Data in Brief item will be transferred over to Data in Brief, so ensure all of your relevant Data in Brief documents are zipped into a single file. Also, make sure you change references to supplementary material in your Experimental Parasitology manuscript to reference the Data in Brief article where appropriate.

Questions? Please contact the Data in Brief publisher, Paige Shaklee at [dib@elsevier.com](mailto:dib@elsevier.com)

Example Data in Brief can be found here: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/23523409>

Thank you, and we look forward to receiving your revised manuscript.

With kind regards,

Bernd Kalinna  
Editor-in-Chief  
Experimental Parasitology

### **Characterization of the *N*-glycans of female *Angiostrongylus cantonensis* worms**

Carolina M. Veríssimo<sup>a,b\*</sup>, Alessandra L. Morassutti<sup>a</sup>, Mark von Itzstein<sup>b</sup>, Grigorij Sutov<sup>c</sup>, Lauren Hartley-Tassell<sup>b</sup>, Sarah McAtamney<sup>b</sup>, Anne Dell<sup>c</sup>, Stuart M. Haslam<sup>c</sup>, Carlos Graeff-Teixeira<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Parasitologia Molecular – Instituto de Pesquisas Biomédicas and Laboratório de Biologia Parasitária, Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS 90060-900, Brazil.

<sup>b</sup>Institute for Glycomics – Griffith University, Gold Coast Campus, Queensland 4222, Australia.

<sup>c</sup>Department of Life Sciences, Faculty of Natural Sciences, Imperial College London, London, SW7 2AZ, United Kingdom.

\*Corresponding author: Carolina De Marco Veríssimo Phone: (55) 51-3320-3353; Ramal:2170 Fax: (55) 51- 3320-3353; E-mail: caroldmv@yahoo.com.br

## ABSTRACT

Glycoconjugates play a crucial role in the host-parasite relationships of helminthic infections, including angiostrongyliasis. It has previously been shown that the antigenicity of proteins from female *Angiostrongylus cantonensis* worms may depend on their associated glycan moieties. Here, an *N*-glycan profile of *A. cantonensis* is reported. A total soluble extract (TE) was prepared from female *A. cantonensis* worms and was tested by dot blot before and after glycan oxidation or *N*- and *O*-glycosidase treatment. The importance of *N*-glycans for the immunogenicity of *A. cantonensis* was demonstrated when deglycosylation of the TE with PNGase F completely abrogated IgG recognition. The TE was also fractionated using various lectin columns [*Ulex europaeus* (UEA), *concanavalin A* (Con A), *Arachis hypogaea* (PNA), *Triticum vulgare* (WGA) and *Lycopersicon esculentum* (LEA)], and then each fraction was digested with PNGase F. Released *N*-glycans were analyzed with matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI)-time-of-flight (TOF)-mass spectrometry (MS) and MALDI-TOF/TOF-MS/MS. Complex-type, high mannose, and truncated glycan structures were identified in all five fractions. Sequential MALDI-TOF-TOF analysis of the major MS peaks identified complex-type structures, with a  $\alpha_{1-6}$  fucosylated core and truncated antennas. Glycoproteins in the TE were labeled with BodipyAF558-SE dye for a lectin microarray analysis. Fluorescent images were analyzed with ProScanArray imaging software followed by statistical analysis. A total of 29 lectins showed positive binding to the TE. Of these, *Bandeiraea simplicifolia* (BS-I), PNA, and *Wisteria floribunda* (WFA), which recognize galactose (Gal) and *N*-acetylgalactosamine (GalNAc), exhibited high affinity binding. Taken together, our findings demonstrate that female *A. cantonensis* worms have characteristic helminth *N*-glycans.

**KEYWORDS:** *Angiostrongylus cantonensis*, Glycans, Lectin array, Mass spectrometry

## 1. INTRODUCTION

Eosinophilic meningoencephalitis (EoM) is often caused by the nematode, *Angiostrongylus cantonensis*. For cases specifically involving infection by this nematode, the resulting condition is referred to as cerebral angiostrongyliasis (CA), which is endemic in many parts of the world, particularly in tropical and subtropical countries (Morassutti et al., 2014; Wang et al., 2012, 2008).

Humans can acquire the infection by consuming third stage larvae (L3) that are present in contaminated water, in raw and undercooked food, fruits, and vegetables, or in molluscs, which serve as the intermediate host for this infection (Wang et al., 2008). After ingestion, the larvae access the central nervous system via the bloodstream and cause severe inflammation that results in EoM, which in some cases may be fatal (Graeff-Teixeira et al., 2009; Wang et al., 2008).

Female *A. cantonensis* worms express different proteins that may influence many physiological and pathological processes, including interactions with the host's immune system (Song et al., 2012; Wang et al., 2008). For example, when an antigen prepared from the reproductive tubes of female *A. costaricensis* worms, a species which can cause abdominal angiostrongyliasis, high antigenicity was observed with human sera (Bender et al., 2003). In addition, the main diagnostic antigen for CA is a glycoprotein that is obtained from female *A. cantonensis* worms (Morassutti et al., 2012).

Several studies have highlighted the importance of glycans as dominant antigens based on their ability to interact with a host's immune system, mainly because these glycan are located on the surface of the parasite (Nyame et al., 2004). Especially, glycans are involved in the generation of anti-glycan antibodies (Nyame et al., 2003; Sher et al., 2003; van Die & Cummings, 2006; Van Liempt et al., 2007).

Glycans are known to be recognized by immunoglobulins in a specific way (Reason et al., 1994; van Die & Cummings, 2006). In a recent proteomic study of the

31-kDa antigen from *A. cantonensis*, recognition of this antigen by human antibodies was found to be dependent on the carbohydrate moieties present (Morassutti et al., 2012). Correspondingly, attempts to produce recombinant antigens of *Angiostrongylus* in prokaryotic systems have failed (Morassutti et al., 2013), potentially due to a lack of proper glycosylation (Dell et al., 2010).

Therefore, in order to obtain a better understanding of parasite biology and host-parasite interactions, a study of *Angiostrongylus* carbohydrates is necessary. In this study, we report an investigation of glycosylation of *A. cantonensis* worms.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Worms and antigen preparation

The life cycle of *A. cantonensis* worms have been maintained at the Laboratório de Biologia Parasitária (PUCRS, Porto Alegre, Brazil) since 2013. *Wistar* rats are used as definitive hosts and *Biomphalaria glabrata* serve as intermediate hosts. Briefly, *Wistar* rats are infected with 104 larvae by gavage inoculation. Forty-two days post-infection, the rats are sacrificed and the worms are collected and frozen at -20 °C. Animal handling for this study was performed according to the guidelines of our institute and the experimental protocol was approved by the PUCRS Ethics Committee for Animal Use (no. 13/000331).

A total soluble extract (TE) was obtained from harvested female *A. cantonensis* worms that were macerated in liquid nitrogen and homogenized in an extraction buffer [phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4), 0.01% Triton X-100, and freshly added protease inhibitors (Qiagen)]. The suspension was centrifuged at 12,000 x g for 1 h at 4 °C. Total protein concentrations of the TE supernatants were estimated with the Qubit kit (Invitrogen, Mount Waverly, Victoria).

### 2.2. Dot blot (DB) with glycosidases and meta-periodate oxidation

TE (1 µg/dot) were directly applied onto nitrocellulose membranes in a drop-wise manner. These membranes were then blocked with 5% milk for 2 h at room temperature (RT) and incubated for 2 h with a pool of sera (1:200 dilution), prepared from three positive sera samples of CA . The membranes were washed three times and probed with a secondary peroxidase-conjugated anti-human IgG (diluted 1:5000; Abcam, Cambridge, UK) for 2 h at RT. Diaminobenzidine (DAB) (Sigma-Aldrich, St.



Louis, MO, USA; 0.05% DAB and 0.015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS, pH 7.4) was added to visualize the bound antibodies.

#### 2.2.1. *N-Glycosidase F (PNGase F) treatment*

PNGase F treatment was performed according to the manufacturer's instructions (recombinant PNGase F, 500,000 U/mL; BioLabs, UK). Briefly, PNGase F was mixed with the TE at a final concentration of 500 U/μg total protein and the samples were incubated overnight at 37 °C. PBS was used as a negative control. The treated samples were then blotted onto nitrocellulose membranes and recognition by CA-positive sera was tested by DB (described above).

#### 2.2.2. *O-Glycosidase treatment*

TE were directly applied into nitrocellulose membranes in a drop-wise manner (1 μg/dot) and these membranes were subsequently blocked with 1% (w/v) bovine serum albumin (BSA). Membranes were either incubated with α-L-fucosidase (0.2 U; Sigma-Aldrich) for 18 h and then were incubated with O-glycosidase (0.02 U; Sigma-Aldrich) for another 18 h at RT, or were directly incubated with O-glycosidase without pre-treatment with α-L-fucosidase. After three washes, DBs were performed (described above).

#### 2.2.3. *Sodium meta-periodate treatment*

TE were directly applied onto nitrocellulose membranes in a drop-wise manner (1 μg/dot), then the membranes were washed three times with PBS-Tween 0.05% (v/v). The membranes were incubated for 30 min with 100 mM NaOAc (pH 5.0), then were incubated with a sodium *m*-periodate solution (20 mM NaIO<sub>4</sub> diluted in 100 mM NaOAc), and kept at 37 °C in the dark. After 1 h, the membranes were washed with 100 mM NaOAc and were incubated with 50 mM NaBH<sub>4</sub> in PBS-Tween 0.05% (v/v) for 30 min at RT. DBs were then performed (described above).

### 2.3. *Lectin columns*

To enrich the glycoconjugate forms of the *A. cantonensis* antigen, various commercially available biotinylated lectins were used: *Concanavalin A* (Con A), *Ulex europaeus* (UEA), *Arachis hypogaea* (PNA), *Triticum vulgare* (WGA), and *Lycopersicon esculentum* (LEA) (Sigma-Aldrich). Briefly, 200  $\mu$ L of streptavidin-coated magnetic beads were mixed with 50  $\mu$ g of each biotinylated lectin in separate microtubes, and these tubes were incubated overnight at RT. The supernatant from each tube was subsequently removed and the columns were washed five times with Tris-buffered saline (TBS, pH 7.4). TE (300  $\mu$ g) was then added to each column and the tubes were incubated at RT for 1 h. Unbound molecules were subsequently removed with aspiration of the supernatant and five washes with TBS. Glycans and glycoconjugated molecules bound to the columns were released when 50  $\mu$ L of 0.1 M sodium borate (pH 6.5) was added to each tube. The resulting fractions were stored at -20 °C until MS analysis.

#### 2.4. Mass spectrometry (MS) analysis

The collected fractions of purified glycoconjugates were reduced, carboxymethylated, and digested with trypsin. *N*-glycans were released from the purified glycopeptides by PNGase F digestion and were derivatized by permethylation. *N*-glycan profiles were acquired with a matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometer (Voyager-DETM STR PerSeptive Biosystems). Permethylated samples were dissolved in 10  $\mu$ L of methanol, then 0.5  $\mu$ L of each of these samples were added to 0.5  $\mu$ L of the matrix (20 mg/ml of 2,5-dihydrobenzoic acid in 70% (v/v) aqueous methanol). The sample/matrix mixture was loaded onto a sample plate for MS analysis. MALDI-TOF/TOF experiments were performed with a 4800 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems) using 3,4-diaminobenzophenone (20 mg/ml in 70% (v/v) aqueous acetonitrile) as the matrix. Both instruments were operated in the reflectron positive mode (North et al., 2010).

#### 2.5. Lectin array

The glycoproteins present in the *A. cantonensis* TE were labeled with 10 mM BodipyAF558 succinimidyl ester dye (Invitrogen) in PBS (pH 7.4) for 45 min at RT, the excess dye removed and then were applied to a lectin array according as described in Ardnt et al (2011). BSA was used as a negative control. The acquisition of fluorescent images and subsequent measurements and analyses were made with a ProScanArray Microarray scanner (Perkin Elmer, Waltham, MA) and ScanArray Express software (Perkin Elmer). *T*-tests were performed using Microsoft EXCEL software to analyze the statistical significance of the data.

### 3. RESULTS

#### 3.1. TE from female *A. cantonensis* worms contains *N*-glycans, which are essential for immune recognition

TE that was prepared from female *A. cantonensis* worms was enzymatically or chemically treated to remove or modify glycans with *N*-glycosidase (PNGase F), *O*-glycosidase, or *O*-glycosidase associated with  $\alpha$ -L-fucosidase or *m*-periodate. Recognition of the antigen by CA-positive sera was abrogated when the TE was *N*-deglycosylated (Figure 1). The same results were observed when *m*-periodate was used for glycan oxidation.

#### 3.2. A structural analysis of *N*-glycans from female *A. cantonensis* worms

TE prepared from female *A. cantonensis* worms was also fractionated with five biotinylated lectins: Con A, PNA, WGA, UEA, and LEA. Each fraction was analyzed independently by MS (Table 1, Figure 2). MALDI-TOF-MS data showed that fractions from all five columns presented a very similar set of *N*-glycans, including complex-type ( $\text{Fuc}_{0-1}\text{Hex}_{3-5}\text{HexNAc}_{3-5}$ ), high mannose ( $\text{Hex}_{5-7}\text{HexNAc}_2$ ), and truncated structures ( $\text{Fuc}_{0-1}\text{Hex}_3\text{HexNAc}_2$ ). However, there were some variations in the fractions as well. For example, a high mannose glycan with *m/z* at 1988 was only detected in the fraction from the UEA column, while the signal at *m/z* 1345, representing a truncated structure of  $\text{Fuc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ , was absent in the same

UEA column sample. In addition, only a few structures were observed in the samples from the LEA column (Table 1, Figure 2).

The MS spectra of all the samples were dominated by signals at  $m/z$  1836 and  $m/z$  2041. Based on sequential MALDI-TOF-TOF analyses that were subsequently performed (Figure 2), as well as MS/MS fragmentation data and available knowledge regarding biosynthetic pathways, we propose that the corresponding structures for these two signals are core fucosylated ( $\alpha_{1-6}$ ) bi-antennary glycans, the structure at  $m/z$  1836 has two unextended GlcNAc antenna, whilst the structure at  $m/z$  2014 has one unextended GlcNAc antenna and one Gal-GlcNAc antenna.

### 3.3. Lectin binding profile of female *A. cantonensis* glycoproteins

A panel of 86 lectins at three different concentrations was used to assay the glycan signature of the TE obtained from female *A. cantonensis* worms. Table 2 summarizes all of the lectins that exhibited positive binding, along with, their respective degree of affinity and the glycan structure which is known to interact with each lectin (Tao et al., 2008). This analysis demonstrated that glycoproteins present in the TE mainly bound with high affinity mainly to *Bandeiraea simplicifolia* (BS-I), *Arachis hypogaea* (PNA), and *Wisteria floribunda* (WFA) lectins. Conversely, the TE bound with less affinity to lectins that have been shown to bind structures such as fucose (*Pseudomonas aeruginosa* lectin - LecB (PA-IIL), fucosylated core (*Lens culinaris* - LcH), complex-type structures such as Gal $\beta_{1-4}$ GlcNAc $\beta_{1-2}$ Man (*Phaseolus vulgaris* - PHA-L), and mannose-terminal structures (*Galanthus nivalis* - GNA).

## 4. DISCUSSION

To our knowledge, this study presents the first data for glycans from *A. cantonensis* worms. The diversity of the *N*-linked glycans that were detected was demonstrated with MS and lectin microarrays. Also we have shown that antigenicity of the TE was dependent on the presence of carbohydrate structures.

Previously, by used carbohydrate oxidation, our group demonstrated that glycans are essential for an immunodiagnosis of angiostrongyliasis (Morassutti et al., 2012). Our hypothesis was that oxidized carbohydrates that were still attached to

proteins could block immunoglobulin binding sites, since the oxidation treatment would affect the presentation of the glycans present. In the current study, we further demonstrate the importance of glycans for immunoglobulin recognition, and also show that this recognition is specifically due to *N*-glycans, since total abrogation of sera recognition was observed after the TE was subjected to an *N*-glycosidase treatment. In contrast, when an *O*-glycosidase treatment was applied to the TE, no change in IgG recognition was observed. However, it should be noted that *O*-glycosidase has a relatively restricted activity, just only against the Core 1 disaccharides (Fijita et al., 2005) (Figure 1).

The present data is in accordance with the results of several studies which have demonstrated that immunodominant epitopes of nematode surfaces, or excreted/secreted antigens, are often *m*-periodate and/or peptide-*N*-glycosidase sensitive (Haslam et al., 2003; Hokke et al., 2007; Okano et al., 2001; Sotillo et al., 2014; Talabnin et al., 2013). However, there are some exceptions where *O*-glycans have been found to be more immunogenic (Sotillo et al., 2014).

The MALDI-TOF spectra of the *N*-glycans present in the TE prepared from female *A. cantonensis* worms (Table 1), that were enriched using five different lectin columns, trapped a very similar set of *N*-glycans in each fraction. These results suggest that the glycoconjugates present in the TE may have more than one site of glycosylation that can be occupied by different glycan structures.

The characteristic features that have been observed for glycans from other helminths include termination with Gal and GlcNAc (Haslam et al., 1996, 1998, 2003; Hokke et al., 2007; Jang-Lee et al., 2005; Wisniewski et al., 1993; Wuhler et al., 2006) and an absence of sialic acid, as it is believed that this sugar in these parasites (van Die & Cummings, 2010). Nevertheless, among helminths, sialic acid has been documented in *Mesocestoides vogae* (Medeiros et al., 2008) and *Echinococcus granulosus* (Alvarez-Errico et al., 2001), and in both cases, it was not detected by structural analyses, but rather by immune-affinity assays with lectins and monoclonal antibodies. The lectin microarray analysis performed in the present study showed evidence of sialic acid present in the glycoproteins of female *A. cantonensis*, since positive binding was observed to *Limax flavus* (LFA), *Limulus polyphemus* (LPA), and *Polyporus squamosus* (PSL) lectins, which have previously exhibited specificity

for sialic acid (Tao et al., 2008). It is important to note that LFA is similar to LPA with respect to its ability to bind different forms of sialic acid, although LPA may also react with GlcNAc and glucuronic acid. These observations partly explain the present results, yet they do not clarify the LFA binding that was observed (Table 2).

In addition, the fact that sialic acid was observed only by the lectin array analysis and not MS experiments may be due to the five lectins chosen for TE enrichment did not include any lectin able to bind the glycan structure of sialic acid. However, false positive binding in the lectin-based analyses is also possible. Therefore, additional studies that include the LFA, LPA, and PSL columns, as well as MS and a molecular analysis for the identification of specific sequences for enzymes involved in sialic acid synthesis, are necessary to confirm the present data.

Compared with the characteristics of the glycans found in other helminths, it is notable that the Lewis X epitope and multi-fucosylated terminal antennae were not detected in the present study. Fucose was detected at the proximal GlcNAc of the chitobiose core of the *N*-glycans (Fuc $\alpha$ <sub>1-6</sub>GlcNAc) of the TE after digestion with PNGase F. Subsequent digestion of the enriched fractions with PNGase A and an MS analysis did not further identify any glycan structures (data not shown). This is consistent with the observation that PNGase F digestion resulted in the complete abrogation of immune recognition by the female *A. cantonensis* antigen (Figure 1), indicating that the glycans which have immunodiagnostic importance have a core containing fuc $\alpha$ <sub>1-6</sub>, and this is commonly observed among helminths (Haslam et al., 1996, 1997, 1998; Hokke et al., 2007; Houston and Harnett, 2004).

The MS signal at *m/z* 2104 contains a terminal Gal-GlcNAc. Based on MS/MS fragmentation and currently available knowledge regarding biosynthetic pathways, it is likely that this terminal glycan is Gal $\beta$ <sub>1-4</sub>GlcNAc (LacNAc). Studies that have compared the role of LacNAc and the fucosylated homologous (Lewis X) to the shifting of a host immune response towards a Th-2 type have concluded that the fucosylated structure alone is able to drive the immune response towards Th-2 (Okano et al., 2001; Thomas et al., 2003). The ability of parasites to shift a host's response is known to be an important strategy for parasite survival (Sher et al., 2003). In addition, the fact that the glycans from female *A. cantonensis* worms did not contain fucosylated terminal antennae suggest that further studies of the role of

glycans during the infection of permissive versus non-permissive hosts would provide a better understanding of parasite biology and host-parasite relationship.

Of the 86 lectins that were included in the microarray used, 29 showed positive binding to the female *A. cantonensis* TE (Table 2). Of these, three were associated with high affinity interactions and 18 were associated with medium affinity interactions. Interestingly, however, three of the lectins that were used for column purification, UEA, WGA, and LEA, did not exhibit positive binding in the lectin array experiments (Table 1). It is possible that either the glycans present in the TE have very low affinities for these lectins, or the lectins were degraded in the array (Tao et al., 2008). In general, glycoproteins from female *A. cantonensis* worms have been found to bind BS-I, PNA, and WFA lectins, and these are lectins that recognize oligosaccharides such as Gal and GalNAc (terminal). Fucose and complex-type structures were also among structures recognized in the lectin array assay of the present study, and these results are consistent with the glycans that were identified in the MS analyses conducted in the present study and in previous studies with *Schistosoma* parasites (Xu et al., 1994).

*N*-linked glycans are major targets for the host immune system as they play a vital role in immunomodulation by inducing Th-2 type responses (Nyame et al., 2002; Pearce et al., 2004). Thus, *N*-linked glycans may be key to successful parasite defense strategies. The infection of humans by *A. cantonensis* is associated with an exacerbated eosinophilic response that causes inflammatory lesions (Graeff-Teixeira et al., 2009). The structural diversity of glycans, coupled with their accessibility, support a central role for glycans in regulating parasite interactions. Thus, immune and structural characterizations of glycans from *A. cantonensis* with highly specific and sensitive methodologies may facilitate a diagnosis of CA based on the detection of anti-glycan antibodies. Correspondingly, the anti-tyvelose-containing structure of *Trichinella spiralis* (Ellis et al., 1997) and anti-Lewis X antibodies, as well as LDN and the LDNF of *Schistosoma* (Nyame et al., 2003), have been considered potential targets for the immunodiagnosis of parasite diseases.

Based on the ability of lectin-based analyses to discriminate glycan isomers, this approach has the potential to provide a detailed profile of glycoproteins present in different extracts, especially in combination with other techniques. To our

knowledge, the present study represents the first report of glycan data for *A. cantonensis*. Furthermore, we have demonstrated that female *A. cantonensis* worms have mainly complex-type *N*-glycans, with core  $\alpha_{1-6}$  fucosylated and truncated antennas, and these are similar to those observed in other helminths. These insights are important for improving our understanding of host-parasite interactions, and especially for our understanding of the pathogenesis of angiostrongyliasis.

### ACKNOWLEDGEMENTS

Ao Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, Brasil. The mass spectrometry work was supported by the Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBF0083091) to AD and SMH. The authors gratefully acknowledge the Institute for Glycomics, Griffith University - Lectin Array Facility.

### References

- Alvarez-Errico, D., Medeiros, A., Miguez, M., Casaravilla, C., Malgor, R., Carmona, C., Nieto, A., Osinaga, E., 2001. O-Glycosylation in *Echinococcus granulosus*: Identification and characterization of the carcinoma-associated Tn antigen. *Exp. Parasitol.* 98, 100–109.
- Bender, A.G., Maurer, R.L., Silva, M.C.F., Ben, R., Terraciano, P.B., da Silva, A.C.A., Graeff-Teixeira, C., 2003. Eggs and reproductive organs of female *Angiostrongylus costaricensis* are more intensely recognized by human sera from acute phase in abdominal angiostrongyliasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36(4), 449-454.
- Dell, A., Galadari, A., Sastre, F., Hitchen, P., 2010. Similarities and Differences in the Glycosylation Mechanisms in Prokaryotes and Eukaryotes. *International J. Microb.* 1-14.
- Ellis, L.A., McVay, C.S., Probert, M.A., Zhang, J., Bundle, D.R., Appleton, J.A., 1997. Terminal  $\beta$ -linked tyvelose creates unique epitopes in *Trichinella spiralis* glycan antigens. *Glycobiology.* 7, 383–390.



- Fujita, K., Oura, F., Nagamine, N., Katayama, T., Hiratake, J., Sakata, K., Kumagai, H., Yamamoto, K., 2005. Identification and molecular cloning of a novel glycoside hydrolase family of core 1 type O-glycan-specific endo-alpha-N-acetylgalactosaminidase from *Bifidobacterium longum*. *J Biol Chem.* 280(45), 37415-22.
- Graeff-Teixeira, C., da Silva, A.C., Yoshimura, K., 2009. Update on eosinophilic meningoencephalitis and its clinical relevance. *Clin. Microbiol. Rev.* 22(2), 322-438.
- Hartley-Tassell, L.E., Shewell, L.K., Day, C.J., Wilson, J.C., Sandhu, P., Ketley, J.M., Korolik, V. 2010. Identification and characterization of the aspartate chemosensory receptor of *Campylobacter jejuni*. *Mol Microb.* 75(3), 710–730.
- Haslam, S.M., Coles, G.C., Munn, E.A., Smith, T.S., Smith, H.F., Morris, H.R., Dell, A., 1996. *Haemonchus contortus* glycoproteins contain N-linked oligosaccharides with novel highly fucosylated core structures. *J. Biol. Chem.* 271, 30561– 70.
- Haslam, S.M., Khoo, K.H., Houston, K.M., Smith, T.S., Smith, H.F., Morris, H.R., Dell, A., 1997. Characterisation of the phosphorylcholine-containing N-linked oligosaccharides in the excretory-secretory 62 kDa glycoprotein of *Acanthocheilonema viteae*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 85(1), 53-66.
- Haslam, S.M., Coles, G.C., Reason, A.J., Morris, H.R., Dell, A., 1998. The novel core fucosylation of *Haemonchus contortus* N-glycans is stage specific. *Mol. Biochem. Parasitol.* 93(1), 143-147.
- Haslam, S.M., Restrepo, B.I., Óbregón-Henao, A., Teale, J.M., Morris, H.R., Dell, A., 2003. Structural characterization of the N-linked glycans from *Taenia solium* metacestodes. *Mol. & Bioch. Paras.* 126,103-107.
- Hokke, C.H., Deelder, A.M., Hoffmann, K.F., Wuhrer, M., 2007. Glycomics-driven discoveries in schistosome research. *Exp. Parasitol.* 117, 275–83.
- Houston, K.M., Harnett, W., 2004. Structure and synthesis of nematode phosphorylcholine-containing glycoconjugates. *Parasitol.* 129(Pt 6), 655-661.
- Maizels, R.M., Selkirk, M.E., 1988. Immunobiology of nematode antigens, in: Englund, F.A. Sher (Editor). *The Biology of Parasitism*. New York, pp. 285-308.
- Medeiros, A., Chiribao, M.L., Ubillos, L., Festari, M.F., Saldana, J., Robello, C., Dominguez, L., Calvete, J.J., Osinaga, E., 2008. Mucin-type O-glycosylation in *Mesocestoides vogae* (syn. Corti). *Int. J. Parasitol.* 38, 265–276.

- Morassutti, A.L., Levert, K., Perelygin, A., da Silva, A.J., Wilkins, P., Graeff-Teixeira, C., 2012. The 31-kDa antigen of *Angiostrongylus cantonensis* comprises distinct antigenic glycoproteins. *Vector-Borne Zoonot. Dis.* 12(11), 961-968.
- Morassutti, A.L., Perelygin, A., Levert, K., Lin, S.C., Lee, Y.M., da Silva, A.J., Wilkins, P.P., Graeff-Teixeira, C., 2013. Expression of recombinant antigenic proteins from *Angiostrongylus cantonensis*: a brief report. *Hawaii J. Med. Pub. Health.* 72(6 Suppl 2), 58-62.
- Morassutti, A.L., Thiengo, S.C., Fernandez, M., Sawanyawisuth, K., Graeff-Teixeira, C., 2014. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: an emergent disease in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 109(4), 399-407.
- North S.J., Jang-Lee J., Harrison R., Canis K., Ismail M.N., Trollope A., Antonopoulos A., Pang P.C., Grassi P., Al-Chalabi S., Etienne A.T., Dell A., Haslam S.M., 2010. Mass spectrometric analysis of mutant mice. *Methods Enzymol.* 478, 27–77
- Nyame, A.K., Yoshino, T.P., Cummings, R.D., 2002. Differential expression of Lac-DiNAc, fucosylated LacDiNAc, and Lewis X glycan antigens in intramolluscan stages of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 88, 890–897.
- Nyame, A.K., Lewis, F.A., Doughty, B.L., Correa-Oliveira, R., Cummings, R.D., 2003. Immunity to schistosomiasis: Glycans are potential antigenic targets for immune intervention. *Exp. Parasitol.* 104,1–13.
- Nyame, A.K., Kwar, Z.S., Cummings, R.D., 2004. Antigenic glycans in parasitic infections: implications for vaccines and diagnostic. *Arch. Biochem. Biophys.* 426, 182-200.
- Okano, M., Satoskar, A.R., Nishizaki, K., Harn Jr, D.A., 2001. Lacto-Nfucopentaose III found on *Schistosoma mansoni* egg antigens functions as adjuvant for proteins by inducing Th2-type response. *J. Immunol.* 167, 442–450.
- Pearce, E.J., Colleen, M.K., Sun, J., Taylor, J.J., McKee, A.S., Cervi, L., 2004. Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Immunol. Rev.* 201, 117–126.
- Reason, A.J., Ellis, L.A., Appleton, J.A., Wisniewski, N., Grieve, R.B., McNeil, M., Wassom, D.L., Morris, H.R., Dell, A., 1994. Novel tyvelose-containing tri- and

tetra-antennary *N*-glycans in the immunodominant antigens of the intracellular parasite *Trichinella spiralis*. *Glycobiology*. 4, 593–603.

Sher, A., Pearce, E., Kaye, P., 2003. Shaping the immune response to parasites: role of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 15(4), 421-429.

Song, Z., Huang, H., Tan, F., Zhang, E., Hu, J., Pan, C., 2012. Differential proteomics analysis of female and male adults of *Angiostrongylus cantonensis*. *Exp. Parasitol.* 131,169–174.

Sotillo, J., Córtes, A., Muñoz-Antoli, C., Fried, B., Esteban, J.G., Toledo, R., 2014. The effect of glycosylation of antigens on the antibody responses against *Echinostoma caproni* (Trematoda: Echinostomatidae). *Parasit.* 141,1333-340.

Talabnin, K., Aoki, K., Saichua, P., Wongkham, S., Kaewkes, S., Boons, G.J., Sripa, B., Tiemeyer, M., 2013. Stage-specific expression and antigenicity of glycoprotein glycans isolated from the human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. *Int. J. Parasitol.* 43(1), 37-50.

Tao, S.C., Li, Y., Zhou, J., Qian, J., Schnaar, R.L., Zhang, Y., Goldstein, I.J., Zhu, H., Schneck, J.P., 2008. Lectin microarrays identify cell-specific and functionally significant cell surface glycan markers. *Glycobiology*. 8(10), 761–769.

Thomas, P.G., Carter, M.R., Atochina, O., Da'Dara, A.A., Piskorska, D., McGuire, E., Harn, D.A., 2003. Maturation of dendritic cell 2 phenotype by a helminth glycan uses a Toll-like receptor 4- dependent mechanism. *J. Immunol.*171, 5837–841.

van Die, I., Cummings, R.D., 2006. Glycans modulate immune responses in helminth infections and allergy. *Chem. Immunol. Allergy.* 90, 91–112.

van Die, I., Cummings, R.D., 2010. Glycan gimmickry by parasitic helminths: A strategy for modulating the host immune response? *Glycobiology*. 20(1), 2–12.

van Liempt, E., van Vliet, S.J., Engering, A., García Vallejo, J.J., Bank, C.M., Sanchez-Hernandez, M., van Kooyk, Y., van Die, I., 2007. *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation. *Mol. Immunol.* 44, 2605–615.

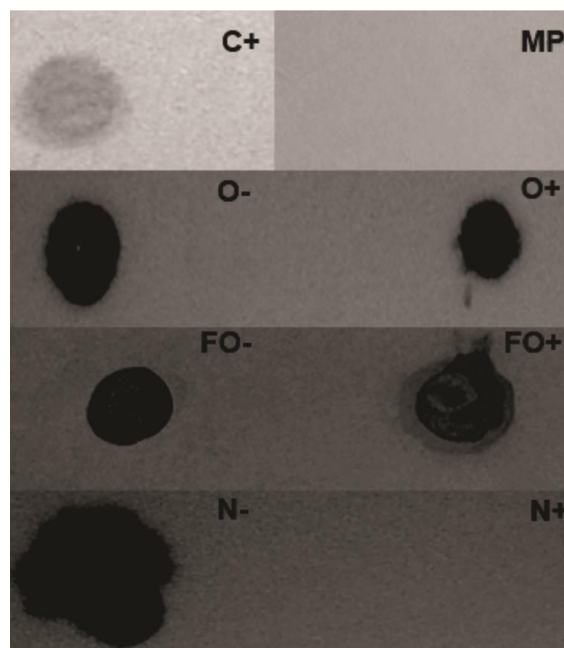
Xu, X., Stack, R.J., Rao, N., Caulfield, J.P., 1994. *Schistosoma mansoni*: fractionation and characterization of the glycocalyx and glycogen-like material from cercariae. *Exp. Parasitol.* 79(3), 399-409.

Wang, Q.P., Lai, D.H., Zhu, X.Q., Chen, X.G., Lun, Z.R., 2008. Human Angiostrongyliasis. *Lancet. Infect. Dis.* 8, 621-630.

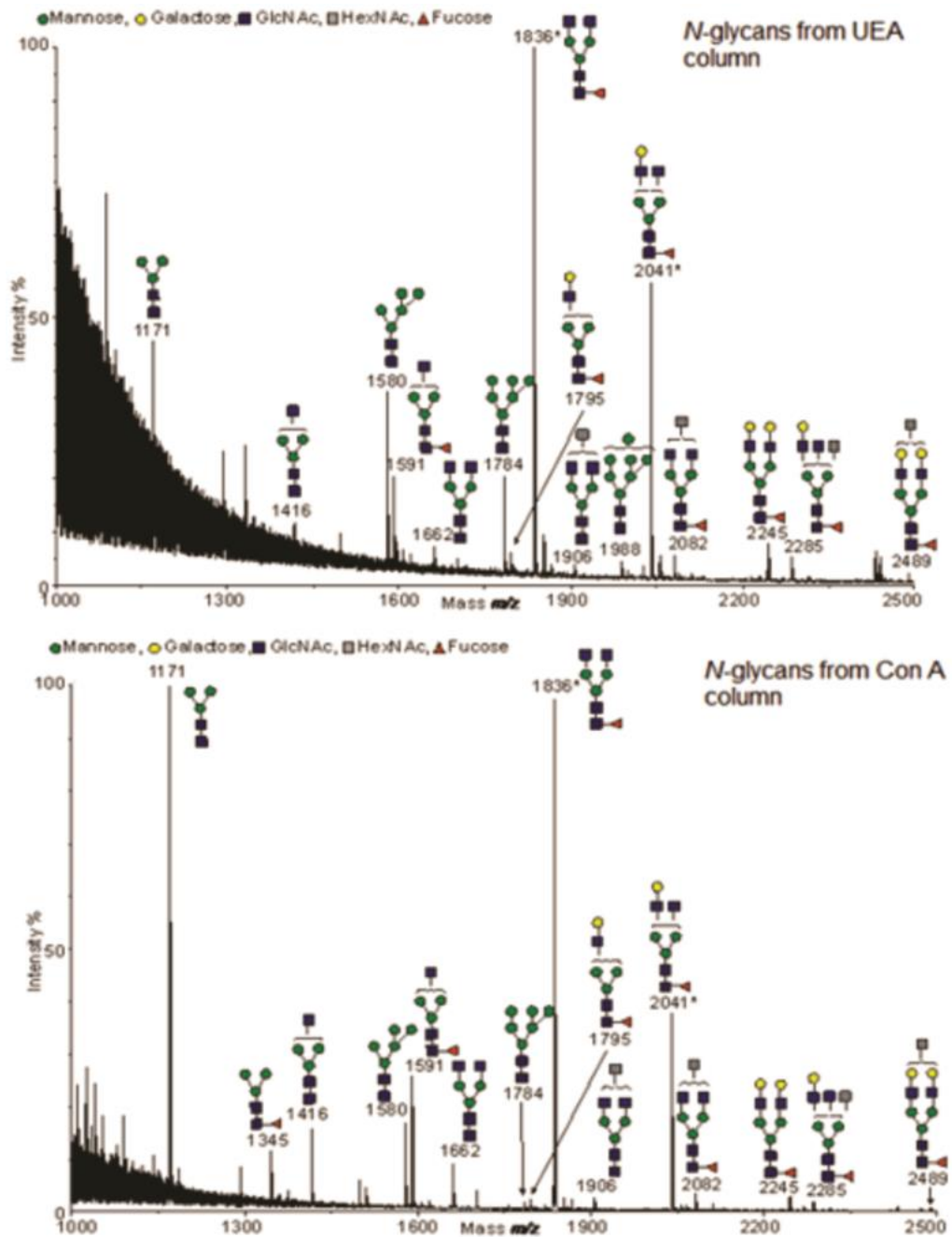
Wisnewski, N., McNeil, M., Grieve, R.B., Wassom, D.L., 1993. Characterization of novel fucosyl- and tyvelosyl-containing glycoconjugates from *Trichinella spiralis* muscle stage larvae. *Mol. Biochem. Parasitol.* 61, 25–35.

Wuhrer, M., Koeleman, C.A., Deelder, A.M., Hokke, C.H., 2006. Repeats of LacDiNAc and fucosylated LacDiNAc on *N*-glycans of the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Febs J*, 273, 347–361.

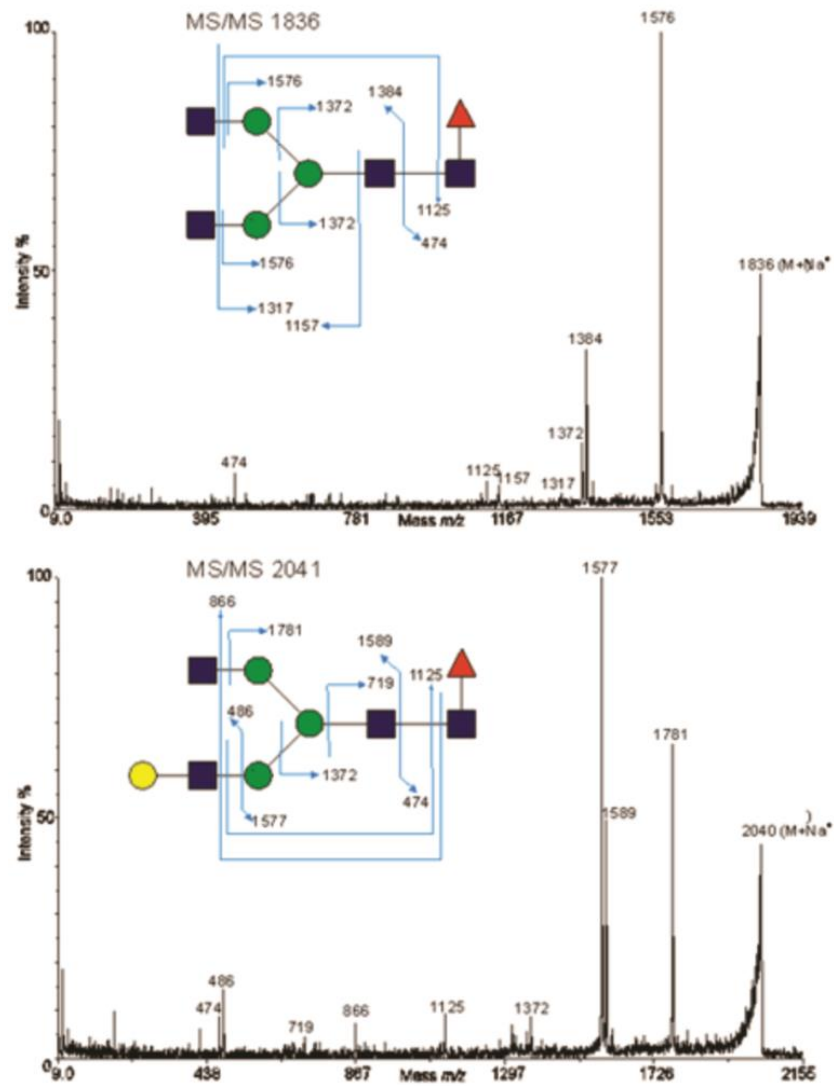
## Figures and Legends



**Figure 1.** *N*-glycans influence the immunoglobulin recognition of a TE prepared from female *A. cantonensis* worms. C+: TE; MP: TE treated with *m*-periodate; O+: TE treated with *O*-glycosidase; FO+: TE treated with  $\alpha$ -L-Fucosidase and *O*-glycosidase; N+: TE treated with *N*-glycosidase (PNGase F); O-, OF- and N-: TE without enzyme treatment.



**Figure 2.** MALDI-TOF spectrum of permethylated *N*-glycans in TE prepared from female *A. cantonensis* worms. *N*-glycans in the TE were enriched by using different biotinylated lectin columns. Bound glycans were released from the tryptic glycopeptides by digestion with PNGase F and permethylated prior to analysis.



**Figure 3.** MALDI-TOF/-TOF-MS/MS spectrum of the two major peaks,  $m/z$  1836 and  $m/z$  2041, that were identified in the MS analysis of the TE prepared from female *A. cantonensis* worms. The complex *N*-glycan at  $m/z$  2041 included GlcNAc and LacNAc structures that could be present on either antennae.

**Table 1.** Assignments of molecular ions ( $[M+Na]^+$ ) observed in MALDI-TOF spectrum of permethylated *N*-glycans in the TE prepared from female *A. cantonensis* worms.

Proposed Structure	Signal <i>m/z</i>	Glycan type	Lectin columns
Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1171	Truncated	UEA, ConA, PNA, WGA
Fuc <sub>1</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1345	Truncated	ConA, PNA, WGA
Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>3</sub>	1416	Complex	UEA, ConA, PNA, WGA
Man <sub>5</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1580	High mannose	UEA, ConA, PNA, WGA, LEA
Fuc <sub>1</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>3</sub>	1591	Complex	UEA, ConA, PNA, WGA, LEA
HexNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1662	Complex	UEA, ConA, PNA, WGA
Man <sub>6</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1784	High mannose	UEA, ConA, PNA, WGA
Fuc <sub>1</sub> Hex <sub>1</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>3</sub>	1795	Complex	UEA, ConA, PNA, WGA
Fuc <sub>1</sub> HexNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1836	Complex	UEA, ConA, PNA, WGA, LEA
HexNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1906	Complex	UEA, ConA, PNA, WGA
Man <sub>7</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1988	High mannose	UEA
Fuc <sub>1</sub> Hex <sub>1</sub> HexNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	2041	Complex	UEA, ConA, PNA, WGA, LEA
Fuc <sub>1</sub> HexNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	2082	Complex	UEA, ConA, PNA, WGA
Fuc <sub>1</sub> Hex <sub>2</sub> HexNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	2245	Complex	UEA, ConA, PNA, WGA
Fuc <sub>1</sub> Hex <sub>1</sub> HexNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	2285	Complex	UEA, ConA, PNA, WGA
Fuc <sub>1</sub> Hex <sub>2</sub> HexNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	2489	Complex	UEA, ConA, PNA, WGA

UEA: *Ulex europaeus*; ConA: *Concanavalin A*; PNA: *Arachis hypogaea*; WGA: *Triticum vulgare*; LEA: *Lycopersicon esculentum* (Tomato).

**Table 2.** Lectin binding signature of the TE prepared from female *A. cantonensis* worms.

Lectin	Affinity to	Binding intensity
AAA	Fuc $\alpha$ <sub>1-2</sub>	Grey
ACA	Gal $\beta$ <sub>1-3</sub> GalNAc	White
BDA	GalNAc $\alpha$ , GalNAc $\beta$	Grey
BPA	GalNAc $\alpha$ , Gal $\alpha$	Grey
BS-I	Gal $\alpha$ , GalNAc $\alpha$ (terminal)	Dark
CA	Gal $\beta$ <sub>1-4</sub> GlcNAc, GalNAc $\beta$ <sub>1-4</sub> GlcNAc	Grey
ConA	Man (Terminal, Branched), GlcNAc	White
CPA	Man $\alpha$ ? Man?	Grey
CSA	GalNAc $\alpha$ (Terminal)	Grey
ECA	Gal $\beta$ <sub>1-4</sub> GlcNAc (Terminal)	Grey
EEA	GalNAc $\beta$	Grey
GNA	Man $\alpha$ (Terminal)	White
GS-I-B4	Gal $\alpha$ (Terminal)	Grey
HPA	GalNAc $\alpha$ (Terminal)	Grey
LcH	Man/GlcNAc core with Fuc $\alpha$ <sub>1-6</sub>	Grey
LFA	Neu5Ac	Grey
LPA	Neu5Ac	Grey
LBA	GalNAc $\alpha$ , GalNAc $\alpha$ <sub>1-3</sub> (Fuc $\alpha$ <sub>1-2</sub> )Gal	White
MNA-G	Gal $\alpha$ , Gal $\beta$	White
PEA	Man $\alpha$ , Glc $\alpha$ , GlcNAc $\alpha$	Grey
PHA-L	Gal $\beta$ <sub>1-4</sub> GlcNAc $\beta$ <sub>1-2</sub> Man	White
PHA-M	N/A	Grey
PHA-P	N/A	White
PNA	Gal $\beta$ (Terminal)	Dark
PSL	Neu5Ac $\alpha$ <sub>2-6</sub> Gal $\beta$ <sub>1-4</sub> GlcNAc,	Grey
SJL	Gal $\alpha$	White
TKA	Gal $\beta$ , Gal $\beta$ <sub>1-4</sub> Glc (Lactose)	Grey
WFA	GalNAc $\alpha$ , GalNAc $\beta$	Dark
LecB (PA-IIL)	Fuc	Grey

Dark: High affinity; Grey: moderate affinity; White: low affinity.



## SUPPLEMENTARY MATERIAL

**Table 1.** *A. cantonensis* TE female worm lectin array list

Lectin	Abbreviation	Affinity to
<i>Anguilla anguilla</i> Lectin (Fresh Water Eel)	AAA	Fuc $\alpha$ 1-2
<i>Agaricus bisporus</i> Lectin (Mushroom)	ABA	Gal $\beta$ 1-3GalNAc
<i>Amaranthus caudatus</i> Lectin (Amaranthin)	ACA	Gal $\beta$ 1-3GalNAc
<i>Arum maculatum</i> Lectin (Lords and Ladies)	AMA	Man $\alpha$
<i>Allium sativum</i> Lectin (Garlic)	ASA	Man $\alpha$ 1-3
<i>Bryonia dioica</i> Lectin (White Bryony)	BDA	GalNAc $\alpha$ , GalNAc $\beta$
<i>Bauhinia purpurea</i> agglutinin	BPA	GalNAc $\alpha$ , Gal $\alpha$
<i>Bandeiraea simplicifolia</i> Lectin ( <i>Griffonia simplicifolia</i> )	BS-I	Gal $\alpha$ , GalNAc $\alpha$ (terminal)
<i>Colchicum autumnale</i> Lectin ( <i>Meadow Saffron</i> )	CA	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc, GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc
<i>Caragana arborescens</i> Lectin (Pea Tree)	CAA	GlcNAc $\beta$ 1-2Man $\alpha$ 1-3(GlcNAc $\beta$ 1-2Man $\alpha$ 1-6)Man $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$
<i>Calystega sepium</i> Lectin (Hedge Bindweed Rhizomes)	CALSEPA	Man, Glc, Glc $\alpha$ 1-4Glc
<i>Cancer antennarius</i> Lectin (California crab)	CCA	Neu5Ac
<i>Canavalia ensiformis</i> , jack bean	ConA	Man (Terminal, Branched), GlcNAc
<i>Cicer arietinum</i> Lectin (Chick Pea)	CPA	Man $\alpha$ ? Man?
<i>Cytisus sessilifolius</i> Lectin (Portugal Broom)	CSA	GalNAc $\alpha$ (Terminal)
<i>Dolichos biflorus</i> Lectin (Horse Gram)	DBA	GalNAc $\alpha$ 1-3GalNAc, GalNAc $\alpha$ 1-3Gal
<i>Erythrina cristagalli</i> Lectin	ECA	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc (Terminal)

(Coral Tree)

<i>Euonymus europaeus</i> Lectin (Spindle Tree)	EEA	GalNAc $\beta$
<i>Glechoma hederacea</i> Lectin (ground ivy)	GHA	Gal $\alpha$ , GalNAc $\alpha$
<i>Galanthus nivalis</i> agglutinin (snowdrop)	GNA	Man $\alpha$ (Terminal)
<i>Griffonia simplicifolia</i> agglutinin	GS-I-A4	GalNAc $\alpha$
<i>Griffonia simplicifolia</i> agglutinin	GS-I-B4	Gal $\alpha$ (Terminal)
<i>Griffonia simplicifolia</i> lectin	GS-II	GlcNAc $\alpha$ , GlcNAc $\beta$
<i>Helix aspersa</i> Lectin (Garden Snail)	HAA	GlcNAc $\alpha$ , GalNAc $\alpha$
<i>Hippeastrum hybrid</i> Lectin (Amaryllis bulbs)	HHA	Man $\alpha$ (Terminal)
<i>Homarus americanus</i> Lectin (Lobster)	HMA	GalNAc $\alpha$ , Fuca, Neu5Ac
<i>Helix pomatia</i> agglutinin (Roman snail, edible snail)	HPA	GalNAc $\alpha$ (Terminal)
<i>Iberis amara</i> Lectin	IAA	GalNAc
<i>Iris hybrid</i> Lectin (Dutch Iris)	IRA	GalNAc $\alpha$ , GalNAc $\beta$
Jackfruit lectin ( <i>Artocarpus heterophyllus</i> ) (bread fruit tree)	Jacalin	Gal $\alpha$ , Gal $\beta$ , GalNAc $\alpha$ (O-linkage)
<i>Laburnum alpinum</i> Lectin (Scotch Laburnum)	LAA	GlcNAc $\beta$ , GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc
<i>Laburnum anagyroides</i> Lectin (Gold Chain)	LAL	Fuc?
<i>Lens culinaris</i> Lectin (Lentil)	LcH	complex (Man/GlcNAc core with Fuca1-6)
<i>Lens culinaris</i> Lectin (Lentil)	LcHB	$\alpha$ -Man > $\alpha$ -Glc, GlcNAc
<i>Lycopersicon esculentum</i> (Tomato)	LEA	GlcNAc $\beta$
<i>Limax flavus</i> Lectin (Garden Slug)	LFA	Neu5Ac
<i>Tetragonolobus purpureas</i> agglutinin ( <i>Lotus</i>	Lotus	Fuca

<i>tetragonolobus</i> , winged or asparagus pea)		
<i>Limulus polyphemus</i> Lectin (Horseshoe Crab)	LPA	Neu5Ac
<i>Phaseolus lunatus</i> Lectin (Lima Bean)	LBA	GalNAc $\alpha$ , GalNAc $\alpha$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-2)Gal
<i>Maackia amurensis</i> Lectin	MAA	Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal
<i>Mangifera indica</i> Lectin (Mango)	MIA	N/A
Morniga G Lectin (black elderberry)	MNA-G	Gal $\alpha$ , Gal $\beta$
Morniga M Lectin (black elderberry)	MNA-M	Man $\alpha$
<i>Marasmiium oreades</i> agglutinin (mushroom)	MOA	Gal $\alpha$ 1-3
<i>Maclura pomifera</i> Lectin (Osage Orange)	MPA	Gal $\alpha$ , GalNAc $\alpha$
<i>Narcissus pseudo-narcissus</i> Lectin (Daffodil)	NPA	Man $\alpha$ ? Man $\beta$ ?
<i>Persea americana</i> Lectin (Avocado)	PAA	N/A
<i>Pisum sativum</i> Lectin (Garden Pea)	PEA	Man $\alpha$ , Glc $\alpha$ , GlcNAc $\alpha$
<i>Phaseolus vulgaris</i> Lectin (Red Kidney Bean)	PHA-E	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-2(Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6)Man
<i>Phaseolus vulgaris</i> Lectin (Red Kidney Bean)	PHA-L	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-2Man
<i>Phaseolus vulgaris</i> Lectin (Red Kidney Bean)	PHA-M	N/A
<i>Phaseolus vulgaris</i> Lectin (Red Kidney Bean)	PHA-P	N/A
<i>Polygonatum multiflorum</i> Lectin (Common Solomon's Seal)	PMA	Man $\alpha$ 1-3
<i>Arachis hypogaea</i> lectin from peanut	PNA	Gal $\beta$ (Terminal)
<i>Polyporus squamosus</i>	PSL	Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc,

(mushroom)

<i>Psophocarpus tetragonolobus</i> Lectin (Winged Bean)	PTA Gal	Gal
<i>Psophocarpus tetragonolobus</i> Lectin (Winged Bean)	PTA GalNAc	GalNAc
<i>Phytolacca americana</i> Lectin (Pokeweed)	PWM	GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc
<i>Robinia pseudoacacia</i> (Black Locust)	RPA	N/A
<i>Trifolium repens</i> (White Clover)	RTA	Glc?
<i>Salvia horminum</i>	SHA	GalNAc
<i>Sambucus nigra</i> (Elderberry Bark)	SNA	Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal, Neu5Ac $\alpha$ 2-6GalNAc
<i>Sambucus nigra</i> (Elderberry Bark)	SNA-II	Gal $\beta$ (Terminal), GalNAc $\beta$ (Terminal)
<i>Sophora japonica</i> lectin	SJL	Gal $\alpha$
Soybean agglutinin ( <i>Glycine max</i> , soya bean)	SBA	GalNAc $\alpha$ (Terminal), Neu5Ac $\alpha$ 2-6GalNAc (Tn antigen)
<i>Salvia sclarea</i>	SSA	GalNAc, Terminal, O-link
<i>Solanum tuberosum</i> (Potato)	STA	GlcNAc $\beta$
Succinyl Con A Lectin	Succ ConA	Man $\alpha$ , Glc $\alpha$
Succinylated <i>Triticum vulgare</i> (Wheat)	Succ WGA	$\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc
<i>Trichosanthes kirilowii</i> (China Gourd)	TKA	Gal $\beta$ , Gal $\beta$ 1-4Glc (Lactose)
<i>Tulipa</i> sp. Lectin (Tulip)	TL	$\alpha$ -GalNAc, $\beta$ -GalNAc, GalNAc, Gal, Fucose
<i>Urtica dioica</i> Lectin (Stinging Nettle)	UDA	GalNAc $\beta$
<i>Ulex europaeus</i> Lectin (Gorse, Furze)	UEA-I	Fuc $\alpha$
<i>Ulex europaeus</i> Lectin (Gorse, Furze)	UEA-II	GlcNAc $\beta$ , Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-4GlcNAc
<i>Viscum album</i> Lectin (Mistletoe)	VAA	Gal $\beta$

<i>Vicia graminea</i> Lectin	VGA	Gal $\beta$ 1-3GalNAc
<i>Vigna radiata</i> Lectin (Mung Bean)	VRA	Gal $\alpha$
<i>Vicia fava</i> Lectin (Fava Bean)	VFA	Man $\alpha$
<i>Vicia villosa</i> Lectin (Hairy Vetch)	VVA	GalNAc $\alpha$ , GalNAc $\alpha$ 1-3Gal
<i>Vicia villosa</i> Lectin (Hairy Vetch, Mannose Specific)	VVA man	Man
<i>Wisteria floribunda</i> Lectin (Japanese Wisteria)	WFA	GalNAc $\alpha$ , GalNAc $\beta$
<i>Triticum vulgare</i> lectin from wheat germ	WGA	Chitobiose core (Man $\beta$ (1,4) GlcNAc $\beta$ (1,4)GlcNAc)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> lectin	LecB (PA-IIL)	Fuc
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> lectin	LecA (PA-IL)	Gal
<i>Ralstonia solanacearum</i> lectin	RSL	Fuc
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	BC2LA	Man, $\alpha$ Man-terminal

---

## 3 CAPÍTULO 3

### 3.1 General Discussion

Nematodes parasites cause billions of infections around the world, often generating chronic infection associated with high rates of morbidity. The main interface between the host and parasite is the parasite surface that in almost every parasite species is covered by a glycocalyx rich in carbohydrates. In addition, parasites are able to secrete / excrete antigenic glycoconjugates that can disperse around the parasite environment.

Glycosylated epitopes are often the major targets of immunological response of both habitual and accidental hosts, and may be determinants for the successful establishment of an infection. For immunodiagnosis, these glycan epitopes may be specific to a parasite or induce cross reactivity due to their similarity with other helminths (van Remoortere et al., 2003; Romasanta et al., 2003; Ishida et al., 2003). LDN and LDNF, for example, are *N*-glycan structures that are very common among parasites. On the other hand, a single and apparently not important change in the glycan structure may modify completely its immunogenicity. Schistosome parasites, for instance, can produce LDN with fucose in some unique positions such as F-LDN and LDN-diF (van Remoortere et al, 2000), and *Trichinella spiralis* produces tyvelose (Bruschi et al., 2001). These glycan epitopes present high specificity and special potential for differential diagnosis for each respective infection (Nakagaki et al., 1993).

For *A. cantonensis* infection, extensive studies have shown that 31-kDa glycoproteins from soluble crude extracts of female worms are appropriate for serological diagnosis of the infection, given their high sensitivity and specificity (Nuamtanong, 1996; Eamsobhana and Yong, 2009; Morassutti et al., 2012). Morassutti and colleagues (2012; 2013), observed that the recognition of the 31-kDa spots was dependent on glycan moieties that were *m*-periodate sensitive. Further studies reinforced the idea of glycan importance, since recombinant 31-kDa proteins were not recognized in immunological tests (Morassutti et al., 2013), even using prokaryotic and eukaryotic models to produce them.

In the present study we show the first glycan data of *A. cantonensis* worms. Here, we further demonstrate the importance of glycans for immunoglobulin recognition, and also show that this recognition is specifically due to *N*-glycans, since a total abrogation of sera recognition was observed when female TE was subjected to an *N*-glycosidase treatment. In addition, the specific recognition of the 31-kDa antigen is also dependent on the presence of *N*-glycans and not on *O*-glycan, since treatment with *O*-glycosidases did not change the immune recognition of this antigen. The present data is in accordance with the results of several studies, which have demonstrated that immunodominant epitopes of nematode surfaces, or ES antigens, are often *m*-periodate and/or peptide-*N*-glycosidase sensitive (Haslam et al., 2003; Hokke et al., 2007; Okano et al., 2001; Sotillo et al., 2014; Talabnin et al., 2013). In addition, the evidence that different parasites antigens lose their cross reactivity with antibodies after glycosidase treatment (Haslam et al., 2003; Talabnin et al., 2013; Hokke et al., 2007; Sotillo et al., 2014), suggest that further studies with *N*-deglycosylation including sera from patients infected with other parasites could help with improvement of diagnostic methods for angiostrongyliasis.

It is important to consider that in several parts of the world where EM is endemic, people may have different cultural behaviors. Molluscs may be part of their diet. Interestingly, mollusc mucus contains many different types of mucin glycans, a glycan type which has been demonstrated to be recognized by immunoglobulins (Todeschini et al, 2001). Moreover, mollusc glycans can be the same as those found in plants and parasites, causing cross reactivity (van Die & Cummings, 2006). Thus, here we hypothesize that people consuming molluscs have a higher chance of producing antibodies against mollusc glycans, which could be similar or the same as those produced by *Angiostrongylus*. Ultimately it would lead to a false positive result in the current serological test based on 31-kDa antigen, suggesting the need of a better understating of glicidic moieties from mollusks especially those related to *Angiostrongylus* infection and food consume.

*N*-linked glycans are major targets for the host immune system as they play a vital role in immunomodulation by inducing Th-2 type responses (Nyame et al., 2002; Pearce et al., 2004). Thus, *N*-glycans may be a key strategy of parasites in successful evasion host defenses. Human infection by *A. cantonensis* is associated

with an exacerbated eosinophilic response, mainly reinforced by Interleukin 5 (IL5), causing inflammatory lesions (Graeff-Teixeira et al., 2009; Morassutti and Graeff-Teixeira 2012). In this context, different authors have pointed out that glycoproteins from parasite antigens may play an important role in granuloma formation and eosinophil activation during an inflammatory response (Jacobs et al., 1999; Okano et al., 1999). In angiostrongyliasis the eosinophilic response is inferred to culminate in death of larvae in CNS. Here we identified many glycans that could be further studied for their involvement in the eosinophilic response. Having those glycans purified/or produced synthetically we would be able to test this hypothesis in animal experiments, which would be important for new perspectives in EM treatment.

Further work involving the glycans identified here would give us a better comprehension about the host-parasite relationship and pathogenesis of *Angiostrongylus* infection, as studies of specific glycans have shown their ability of modulating host immune response. For instance, Lewis X epitope, which is a fucosylated glycan, is able to change the host immune response towards a Th-2 type (Okano et al., 2001; Thomas et al., 2003). Here we did not find this type of glycan. Instead, we found LacNac, which is a very similar glycan structure lacking only the fucose.

With regard to the importance of glycans in the immune response against parasitic infections, carbohydrates on the parasite surface or in ES can be recognized by Lectin-C receptor present in host cells and induce immune response, and anti-glycan antibodies generation, which can be found in the sera from infected patients. Some infections often result in high IgE titles, and increase in eosinophils and mast cell numbers. In general the anti-glycan antibodies titles are directly proportional to the severity of infection severity (Van Dam et al., 1994; Ko et al., 1990; Nyame et al., 2003; van Remoortere et al., 2001). Thus, identification of anti-glycan antibodies has been often employed in parasitic diagnosis, and would be an alternative for angiostrongyliasis diagnosis.

Here we have shown the glycan profile present in different extracts from *A. cantonensis*, including female TE, male TE, ES antigen, and 31-kDa bands (see Appendix A and C). Male and female worms presented different glycan profiles by MS analysis (Appendex C). However, we could not identify the same glycan



structures previously identified in Veríssimo *et al.* (2016 - paper 1). This discrepancy can be explained by differences in the two techniques applied here, or some other problems related to quality of the sample. It is known that different cell types may present a unique glycan profile (Solis *et al.*, 2015), and glycosylation profiles may change due to environmental and genetic factors, which could explain the differences found in glyco-phenotypes between the *A. cantonensis* samples.

MS analysis of the 31-kDa antigen identified the same *N*-glycan in the three different spots analysed. These glycans present small truncated structures, containing mannose terminals, very common among helminths (Appendix A). Although the 31-kDa is said to be highly specificity, our group has recently shown serological cross reactivity of this antigen with sera of patients infected with many other parasitic infections, as *E. granulosus*, *Toxocara* spp., *Trichinella* spp., *Strongyloides* spp. (Morassutti *et al.*, in preparation). This cross reactivity may be explained by the presence of those common glycans. However, the signature observed by lectin array analysis indicated that 31-kDa antigen possibly contains extra glycan moieties. Thus, complementary analyses are necessary to confirm these glycan structures.

Lectins have long been used for different purposes, including on glycan characterization, in techniques such Western and Dot blots, microarrays and flow cytometry. Lectin-based approaches help in the structural analyses of glycans (Tao *et al.*, 2008), as they can discriminate sugar isomers (Hirabayashi, 2004). In addition, the range of lectins commercially available permit perform a broad spectrum of glycan analysis. The lectin microarray that we used here contained 86 different lectins, in three different concentrations (Supplementary material – paper 1), allowing us to also determine the degree of specificity of each lectin with the glycoproteins present in the samples analysed. Of the total lectins tested, 57 showed positive binding to glycans from different extracts of *A. cantonensis*, with variations in binding signatures among male TE, female TE and ES samples (Appendix C). In genera, each *Angiostrongylus* extract analysed contains a different glycan profile, with variation in the number of positive bindings and/or the specificity of binding.

Interestingly, sialic acid is present in the TE and ES extracts of *A. cantonensis*, since positive binding was observed to *Limaxflavus* (LFA), *Limuluspolyphemus*

(LPA), and *Polyporus squamosus* (PSL) lectins, which have been shown to bind sialic acid (Tao et al., 2008). However, additional bioinformatic analysis searching for glycan biosynthesis routes, in a related project of *A. cantonensis* genome and transcriptome, did not find any enzymes or pathways involved in sialic acid synthesis. Putting these data together with the MS data (paper 1, Appendices A and C), these results suggest a false positive binding for sialic acid in the lectin-based analyses. This idea is supported by different works that highlight the limitations of the lectin array, which include the application of the technique for identify accurate glycan structures. Specially when applied to complex samples, like *A. cantonensis* ET and ES samples, the glycan structures should be confirmed using more sophisticated approaches, such as MS analysis (Hirabayashi, 2004). Another limitation is the lack of the commercial availability of lectins or other sugar-binding proteins that diversely recognize unique sugar structures, generating false positive bindings (Hsu et al., 2006).

The reactivity of O-glycans in purified 31-kDa glycoproteins or female TE was screened by reductively eliminating the glycans after PNGase *F* treatment. No signals corresponding to O-glycans were observed. This is consistent with our observations in WB analysis, where the O-glycosidase treatment did not change the immune recognition of TE or 31-kDa antigen. However, when we did an *in silico* analysis of the *A. cantonensis* genome and transcriptome, searching for sequences that codifying enzymes related to glycan biosynthesis, we found GALNT and C1GALT1 / C1GALT1C1 sequences in both materials analysed. These are specific sequences for enzymes involved with O-glycans biosynthesis (Appendix C), suggesting that the parasite is able to produce O-linked glycans, even though we were not able to identify it in our MS analysis.

Our *in silico* analyses also have shown that both genome and transcriptome of *A. cantonensis* have sequences encoding enzymes of the metabolic pathways of N- and O-glycans biosynthesis (Appendix C). Interestingly, those enzymes are predicted to be able to produce the glycans structures that were identified by our MS and lectin array analysis. For instance, the 6-alpha-L-fucosyltransferase, identified by *in silico* analysis, is an enzyme responsible for making core  $\alpha_{1-6}$  fucosylation, which ultimately forms N-glycans susceptible to digestion of PNGase *F*. These data are in accordance

with our MS and immunogenicity analyses where all *N*-glycans were susceptible to PGNase *F* treatment (Capítulo 2), showing the value of the *in silico* analysis to predict glycosylation in *A. cantonensis*.

Due to the central role that 31kDa *N*-glycans play in EM diagnosis, we also investigated by *in silico* methods the possible *N*-glycosylation sites and the glycans structures that could be present in the NAC dominium, 14-3-3 protein, and epsilon coatamer subunit, glycoproteins previously identified as part of the 31-kDa component (Morassutti et al., 2012). The modeling analysis (Appendix A) of the available pepitide sequences showed that all three proteins studied containg *N*-glycosylation sites, and the calculated *N*-glycan sites may comport small structures, such as Man<sub>3-5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> which are in accord with those glycans identified by MS analysis (Appendix A).

Here we also studied the immunological cross reactivity and the 31-kDa recognition between individuals infected with *A. mackerrasae* and *A. cantonensis*. *A. mackerrasae* is a second species of *Angiostrongylus* endemic in Australia. Genetic comparisons of mitochondrial DNA suggests the two species are 99% identical (Aghazadeh et al., unpublished data) thus, there is a strong potential for *A. mackerrasae* also be a zoonotic infection, although much of its epidemiology and pathogenesis remains unknown. Here we found (Appendix B) that *A. mackerrasae* antigen can also be recognized at 31-kDa band by sera from human infected with *A. cantonensis*, and that this recognition is dependent on the presence of *N*-glycans. This cross reactivity was expected due to the genetic proximity of the two Australian species (Aghazadeh et al 2015, unpublished data). In addition, previous work of our group have demonstrated cross reactivity between *A. cantonensis* and another species, *A. costaricensis* (Ben et al., 2010). Morassutti et al. (2012) corroborated with these data showing that the 31-kDa antigen from *A. cantonensis* is also recognized by both sera from patients with EM and abdominal angiostrongyliasis, indicating that both species of parasites produce very similar antigens. Our data point to the need for further studies about *A. mackerrasae* human infection in order to determine the interference of this epitopes in the diagnosis with possible mixed infections in endemic areas for *A. mackerrasae* occurrence.

Taking together, the glycan profile of *A. cantonensis* presents common features that have been observed for glycans from other helminths, which include the presence of complex and truncated structures, the termination with Gal and GlcNAc (Haslam et al., 1996, 1998, 2003; Hokke et al., 2007; Jang-Lee et al., 2005; Wisnewski et al., 1993; Wuhrer et al., 2006), and an absence of sialic acid (van Die & Cummings, 2010). In addition, the information generated in this work give new perspectives to studies of diagnosis of angiostrongyliasis. In regard to the 31-kDa antigens, complementary analysis of the glycan component of the antigen molecules would allow for the development of new strategies for its recombinant production, in a biological system or synthetically.

### 3.2 Conclusion

- *A. cantonensis* TE extracts and ES contains *N*-glycans with common features, mainly truncated and high mannose structures.
- In our MS analyses we did not identify signals for *O*-glycans.
- In the *in silico* analysis we identified sequences of enzymes involved in *O*-glycans biosynthesis.
- The main glycan structure identified in this work is a complex *N*-glycan, with truncated antennas containing Gal and GlcNAc terminals, and core  $\alpha_{1-6}$  fucosylated.
- In this work, we did not identify fucosylated terminals in the *A. cantonensis* glycans.
- *N*-glycans are responsible for immune recognition by human Immunoglobulins.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-QARN, M.; EICHLER, J.; SHARON, N. (2008). **Not just for Eukarya anymore: protein glycosylation on bacteria and Archaea.** *Curr. Opin. Struct. Biol*, 18: 544-50.

AKAO N.; KONDO K.; OHYAMA T.A.; CHEN E.R.; SANO, M. (1992). **Antigens of adult female worm of *Angiostrongylus cantonensis* recognized by infected humans.** *Jpn Int J Parasitol*, 41: 225-231.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. (2006). **Pathogen recognition and innate immunity.** *Cell*, 124:783–801.

ALARCÓN DE NOYA, B.; COLMENARES, C.; LANZ, H.; CARACCILO, M.A.; LOSADA, S.; NOYA, O. (2000). ***Schistosoma mansoni*: immunodiagnosis is improved by sodium metaperiodate which reduces cross-reactivity due to glycosylated epitopes of soluble egg antigen.** *Exp Parasitol*, 95(2):106-12.

ALVAREZ-ERRICO, D.; MEDEIROS. A.; MIGUEZ, M.; CASARAVILLA, C.; MALGOR, R.; CARMONA, C.; NIETO, A.; OSINAGA, E. (2001). **O-Glycosylation in *Echinococcus granulosus*: Identification and characterization of the carcinoma-associated Tn antigen.** *Exp Parasitol.*, 98:100–109.

APWEILER, R.; HERMIAKOB, H.; SHARON, N. (1999). **On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database,** *Biochim. Biophys. Acta*, 1473, 4–8.

BARRETT, A.J. (1997). **Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB).** Enzyme Nomenclature. Recommendations. Supplement 4: corrections and additions. *Eur J Biochem.* 15, 250(1): 1-6.

BEN, R.; RODRIGUES, R.; AGOSTINI, A.A.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. (2010) **Use of heterologous antigens for the immunodiagnosis of abdominal angiostrongyliasis by an enzyme-linked immunosorbent assay.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 105(7): 914-7.

- BEHM, C.A. (1997). **The role of trehalose in the physiology of nematodes.** *Int Jour Parasitol.* 27, 215–229.
- BERGWERFF, A.A.; VAN DAM, G.J.; ROTMANS, J.P.; DEELDER, A.M.; KAMERLING, J.P.; Vliegenthart, J.F. (1994). **The immunologically reactive part of immunopurified circulating anodic antigen from *Schistosoma mansoni* is a threonine-linked polysaccharide consisting of --> 6)-(beta-D-GlcpA-(1 --> 3))-beta-D-GalpNAc-(1 --> repeating units.** *J Biol Chem.* 269(50):31510-17.
- BOLGER, A.M.; LOHSE, M.; USADEL, B. (2014). **Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data.** *Bioinformatics.* 30(15): 2114-20.
- BRODSKYN, C.; PATRICIO, J.; OLIVEIRA, R.; LOBO, L.; ARNHOLDT, A.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. (2002). **Glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi* interfere with macrophages and dendritic cell responses.** *Infect Immun.*, 70(7):3736-43.
- BROCKHAUSEN, I. (2007). **Glycosyltransferases specific for the synthesis of mucin-type O-glycans.** *Glycobiology*, Scion Publishing Ltd, Bloxham, Oxfordshire, pp. 217–234.
- BRUSCHI, F.; MORETTI, A.; WASSOM, D.; PIERGILI FIORETTI, D. (2001). **The use of a synthetic antigen for the serological diagnosis of human trichinellosis.** *Parasite.*, 8(2 Suppl):S141-3.
- BULIK, D.A.; VAN OPEHEM, P.; MANNING, J.M.; SHEN, Z.; NEWBURG, D.S.; JARROLL, E.L. (2000). **UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase, a key enzyme in encysting *Giardia*, is allosterically regulated.** *J. Biol. Chem.*, 275:14722-28.
- BURGHANUS, P.A.; GEROLD, P.; PAN, W.; SCHWARZ, R.T.; LINGELBACK, K.; BUJARD, H. (1999). **Analysis of recombinant merozoite surface protein-1 of *Plasmodium falciparum* expressed in mammalian cells.** *Mol Biochem. Parasitol.*, 104: 171-183.
- CALDEIRA, R.L.; CARVALHO, O.S.; MENDONÇA, C.L.F.G.; GRAEFF-TEIXEIRA, C.; SILVA, M.C.F.; BEM, R.; MAURER, R.; LIMA, W.S.; LENZI, H.L. (2003). **Molecular differentiation of *Angiostrongylus costaricensis*, *A. cantonensis* and**

**A. vasorum** by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 98: 1039-1043.

CALDEIRA, R.L.; MENDONÇA, C.L.G.F.; GOVEIA, C.O.; LENZI, H.L.; GRAEFF-TEIXEIRA, C.; LIMA, W.S.; MOTA, E.S.; PECORA, I.L.; MEDEIROS, A.M.Z.; CALDEIRA, O.S. (2007). **Firts record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 102: 887-889.

CAMBI, A.; GIJZEN, K.; DE VRIES, L.J.; TORENSMA, R.; JOOSTEN, B.; ADEMA, G.J.; NETEA, M.G.; KULLBERG, B.J.; ROMANI, L.; FIGDOR, C.G. (2003). **The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells.** *Eur J Immunol.*, 33(2):532-8.

CASARAVILLA, C.; FREIRE, T.; MALGOR, R.; MEDEIROS, A.; OSINAGA, E.; CARMONA, C. (2003). **Mucin-type O-glycosylation in helminth parasites from major taxonomic groups: evidence for widespread distribution of the Tn antigen (GalNAc-Ser/Thr) and identification of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase activity.** *J Parasitol.* 89(4):709-14.

CHEN, H.T. (1935). **Un Nouveau Nematode Pulmonaire, *Pulmonema cantonensis* n.g.n.sp., des Rats de Canton.** *Ann. Parasitol*, 13: 312-317.

CHEN, S.N. (1986). **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to *Angiostrongylus cantonensis*.** *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 80: 398-405.

CHEN, K.M.; LAI, S.C. (2007). **Biochemical and pathological evaluation of albendazole/thalidomide co-therapy against eosinophilic meningitis or meningoencephalitis induced by *Angiostrongylus cantonensis*.** *J Antimicrob Chemother*, 59:264–276.

CHEN, X.; LI, Z.Y.; MALEEWONG, W.; MALEEWONG, P.; LIANG, J.; ZENG, X.; ZHENG, H.; WU, Z.D.; SUN, X. (2014). **Serum aca-mir-146a is a potential biomarker for early diagnosis of *Angiostrongylus cantonensis* infection.** *Parasitol Res.*, 113(9): 3221-7.



- CHYE, S.M.; YEN, C.M.; CHEN, E.R. (1997). **Detection of circulating antigen by monoclonal antibodies for immunodiagnosis of angiostrongyliasis.** *Am J Trop Med Hyg*, 56: 408-412.
- CIPOLLO, J.F.; ARWAD, A.M.; COSTELLO, C.E.; HIRSCHBERG, C.B. (2005). **N-glycans of *Caenorhabditis elegans* are specific to developmental stages.** *J. Biol. Chem.*, 280: 26063-72.
- CLARK, I.A.; SCHOFIELD, L. (2000). **Pathogenesis of malaria.** *Parasitol Today.*, 16(10):451-4.
- COLMENARES, M.; CORBÍ, A.L.; TURCO, S.J.; RIVAS, L. (2004). **The dendritic cell receptor DC-SIGN discriminates among species and life cycle forms of *Leishmania*.** *J Immunol.*, 172(2):1186-90.
- COOKE-YARBOROUGH, C.M.; KORNBERG, A.J.; HOGG, G.G.; SPRATT, D.M.; FORSYTH, J.R.L. (1999). **A fatal case of angiostrongyliasis in an 11-month-old infant.** *Med J Aust*, 170: 541-543.
- CORFIELD, A.P. (2014). **Mucins: A biologically relevant glycan barrier in mucosal protection.** *Biochim Biophys Acta*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.05.003>
- COSTA, F.; FRANCHIN, G.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L.; RIBEIRÃO, M.; SCHENKMAN, S.; RODRIGUES, M.M. (1998). **Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice.** *Vaccine.*, 16(8):768-74
- CROSS, J.H.; CHI, J.C. (1982). **ELISA for the detection of *Angiostrongylus cantonensis* antibodies in patients with eosinophilic meningitis.** *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 13: 73-76.
- CROSS, J.H. (1987). **Public health importance of *Angiostrongylus cantonensis* and its relatives.** *Parasitol. Today*, 3: 367-369.
- CUMMINGS, R.D. (2009). **The repertoire of glycan determinants in the human glycome.** *Mol Biosystems.*, 5:1087–1104.

- CUMMINGS, R.D.; NYAME, A.K. (1996). **Glycobiology of schistosomiasis.** *FASEB J.*, 10:838–848.
- CUMMINGS, R.D.; NYAME, A.K. (1999). **Schistosome glycoconjugates.** *Biochim Biophys Acta*, 1455:363–374.
- DELL, A.; HASLAM, S.M.; MORRIS, H.R.; KHOO, K.H. (1999). **Immunogenic glycoconjugates implicated in parasitic nematode diseases.** *Biochim Biophys Acta*. 1455(2-3):353-62.
- DESCOTEAUX, A.; TURCO, S.J. (1999). **Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity.** *Biochim Biophys Acta.*, 1455(2-3):341-52.
- DIAZ, J.H. (2008). **Helminthic eosinophilic meningitis: emerging zoonotic diseases in the South.** *J La State Med Soc.*, 160(6):333-42.
- DIEBOLD, S.S. (2009). **Activation of dendritic cells by Toll-like receptors and C-type lectins.** *Handb Exp Pharmacol.*, 188:3–30.
- DINGLASAN, R.R.; FIELDS, I.; SHAHABUDDIN, M.; AZAD, A.F.; SACCI, J.B. JR. (2003). **Monoclonal antibody MG96 completely blocks *Plasmodium yoelii* development in *Anopheles stephensi*.** *Infect Immun.*, 71(12):6995-7001.
- DIXON, J.B. (1997). **Echinococcosis.** *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*, 20(1):87-94.
- EAMSOBHANA, P.; MAK, J.W.; YONG, H.S. (1995). **Detection of circulating antigens of *Parastrongylus cantonensis* in human sera by sandwich ELISA with specific monoclonal antibody.** *Southeast Asian J Trop Med Public Health.*, 26: 712-715.
- EAMSOBHANA, P.; TUNGTRONGCHITR, A.; WANACHIWANAWIN, D.; YONG, H.S.; MAK, J.W. (1998). **Characterization of 31kda Specific Antigen from *Parastrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae).** *Int. Med. Res. J.* 2(1):9-12.
- EAMSOBHANA, P.; YOOLEK, A.; SUVOUTTHO, S.; SUVOUTTHO, S.. (2001). **Purification of a specific immunodiagnostic *Parastrongylus cantonensis***

antigen by electroelution from SDS-PAGE polyacrylamide gels. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 32 (2): 308-313.

EAMSOBHANA, P.; YOOLEK, A.; KREETHAPON, N. (2003). **Blinded multi-laboratory evaluation of an in-house dot-blot ELISA kit for diagnosing human parastrongyliasis.** *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 34: 1-6.

EAMSOBHANA, P. (2006). **The rat lungworm *Parastrongylus* (= *Angiostrongylus*) *cantonensis*: parasitology, immunology, eosinophilic meningitis, epidemiology and laboratory diagnosis.** Bangkok, Wankaew (IQ) Book Center Co Ltd. 45

EAMSOBHANA, P.; ONGROTCHANAKUN, J.; YOOLEK, A.; PUNTHUPRAPASA, P.; MONKONG, N.; DEKUMYOY, P.. (2006). **Multi-immunoblot for rapid differential diagnosis of eosinophilic meningitis due to parasitic infections.** *J Helminthol*, 80: 249-254.

EAMSOBHANA, P.; YONG, H.S. (2009). **Immunological diagnosis of human angiostrongyliasis due to *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae).** *Int J Infect Dis*, 13: 425-431.

EAMSOBHANA, P.; GAN, X.X.; MA, A.; WANG, Y.; WANACHIWANAWIN, D.; YONG, H.S. (2013). **Dot immunogold filtration assay (DIGFA) for the rapid detection of specific antibodies against the rat lungworm *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongyloidea) using purified 31-kDa antigen.** *J Helminthol*, 28: 1-6.

EBERL, M.; LANGERMANS, J.A.; VERVENNE, R.A.; NYAME, A.K.; CUMMINGS, R.D.; THOMAS, A.W.; COULSON, P.S.; WILSON, R.A. (2001). **Antibodies to glycans dominate the host response to schistosome larvae and eggs: is their role protective or subversive?** *J Infect Dis.*, 183(8):1238-47.

EBERL, M.; LANGERMANS, J.A.; FROST, P.A.; VERVENNE, R.A.; VAN DAM, G.J.; DEELDER, A.M.; THOMAS, A.W.; COULSON, P.S.; WILSON, R.A. (2001b). **Cellular and humoral immune responses and protection against schistosomes induced by a radiation-attenuated vaccine in chimpanzees.** *Infect Immun.*, 69(9):5352-62.

ELLIS, L.A.; MCVAY, C.S.; PROBERT, M.A.; ZHANG, J.; BUNDLE, D.R.; APPLETON, J.A. (1997). **Terminal  $\beta$ -linked tyvelose creates unique epitopes in *Trichinella spiralis* glycan antigens.** *Glycobiology.*, 7:383–390.

ESPÍRITO-SANTO, M.C.; PINTO, P.L.; DA MOTA, D.J.; GRYSCHKEK, R.C. (2013). **The first case of *Angiostrongylus cantonensis* eosinophilic meningitis diagnosed in the city of São Paulo, Brazil.** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 55: 129-132.

FERGUSON, M.A.J.; MURRAY, P.; RUTHERFORD, H.; MCCONVILLE, M.A.J. (1993). **A simple purification of procyclic acidic repetitive protein and demonstration of a sialylated glycosylphosphatidylinositol membrane anchor.** *Biochem. J.*, 291: 51-55.

FERGUSON, M.A.J. (1999). **The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research.** *J Cell Sci.* 1999; 112 (Pt 17):2799-809.

FINCHER, GB. (2009). **Exploring the evolution of (1,3; 1,4)- $\beta$ -D- glucans in plant cell walls: comparative genomics can help!** *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 140-147.

FREIRE, T.;CASARAVILLA, C.; CARMONA. C.; OSINAGA, E. (2003). **Mucin-type O-glycosylation in *Fasciola hepatica*: characterisation of carcinoma-associated Tn and sialyl-Tn antigens and evaluation of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase activity.** *Int J Parasitol.* 33(1):47-56.

GALONIC, D.P.; GIN, D.Y. (2007). **Chemical glycosylation in the synthesis of glycoconjugate antitumour vaccines.** *Nature*, 446: 1000-1007.

GAVEL, Y.; VON HEIJNE, G. (1990). **Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering.** *Protein Eng.*, (3): 433-42,

GEIJTENBEEK, T.B.; VAN VLIET, S.J.; KOPPEL, E.A.; SANCHEZ-HERNANDEZ, M.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.; APPELMELK, B.; VANKOOYK, Y. (2003). **Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function.** *J Exp Med.*, 197:7–17.

GELDHOF, P.; NEULANDS, G.F.; NYAME, K.; CUMMINGS, R.; SMITH, W.D.; KNOX, D.P. (2005). **Presence of the LDNF glycan on the host-protective H-gal-GP fraction from *Haemonchus contortus*.** *Parasite Immunol*, 27(1-2):55-60.

GILLIN, F.D.; REINER, D.S. (1996). **Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*.** *Annu. Rev. Microbiol.*, 50: 679-705.

GOMEZ-GARCIA, L.; RIVERA-MONTOYA, I.; RODRIGUEZ-SOSA, M.; TERRAZAS, L.I. (2006). **Carbohydrate components of *Taenia crassiceps* metacestodes display Th2- adjuvant and anti-inflammatory properties when co-injected with bystander antigen.** *Parasitol Res.*, 99:440–448.

GOWDA, D.C.; DAVIDSON, E.A. (1999). **Protein glycosylation in the malaria parasite.** *Parasitol Today.*, 15(4):147-52.

GRABHERR, M.G.; HAAS, B.J.; YASSOUR, M.; LEVIN, J.Z.; THOMPSON, D.A.; AMIT, I.; ADICONIS, X.; FAN, L.; RAYCHOWDHURY, R.; ZENG, Q.; CHEN, Z.; MAUCELI, E.; HACOEN, N.; GNIRKE, A.; RHIND, N.; DI PALMA, F.; BIRREN, B.W.; NUSBAUM, C.; LINDBLAD-TOH, K.; FRIEDMAN, N.; REGEV, A. (2011). **AnEnPi: identification and annotation of analogous enzymes.** *Nat Biotechnol.* 15, 29(7):644-52.

GRABHERR, M.G.; HAAS, B.J.; YASSOUR, M.; LEVIN, J.Z.; THOMPSON, D.A.; AMIT, I.; ADICONIS, X.; FAN, L.; RAYCHOWDHURY, R.; ZENG, Q.; CHEN, Z.; MAUCELI, E.; HACOEN, N.; GNIRKE, A.; RHIND, N.; DI PALMA, F.; BIRREN, B.W.; NUSBAUM, C.; LINDBLAD-TOH, K.; FRIEDMAN, N.; REGEV, A. (2011). **Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome.** *Nat Biotechnol.* 29(7):644-52.

GRAEFF-TEIXEIRA, C.; DA SILVA, A.C.; YOSHIMURA, K. (2009). **Update on eosinophilic meningoencephalitis and its clinical relevance.** *Clin Microbiol Rev.*, 22(2):322-48.

GUHA-NIYOGI, A.; SULLIVAN, D.R.; TURCO, S.J. (2001). **Glycoconjugate structures of parasitic protozoa.** *Glycobiology.*, 11(4):45R-59R.

- HANSON, S.R.; CULYBA, E.K.; HSU, T.L.; WANG, C.H.; KELLY, J.W.; POWERS, E.T. (2009). **The core trisaccharide of an N-linked glycoprotein intrinsically accelerates folding and enhances stability.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 3131-36.
- HASLAM, S.M.; COLES, G.C.; MUNN, E.A.; SMITH, T.S.; SMITH, H.F.; MORRIS, H.R.; DELL, A. (1996). **Haemonchus contortus glycoproteins contain N-linked oligosaccharides with novel highly fucosylated core structures.** *J Biol Chem.*, 271:30561– 30570.
- HASLAM, S.M.; COLES, G.C.; REASON, A.J.; MORRIS, H.R.; DELL, A. (1998). **The novel core fucosylation of Haemonchus contortus N-glycans is stage specific.** *Mol Biochem Parasitol.*, 93(1):143-7.
- HASLAM, S.M.; HOUSTON, K.M.; HARNETT, W.; REASON, A.J.; MORRIS, H.R.; DELL, A. (1999). **Structural studies of N-glycans of filarial parasites. Conservation of phosphorylcholine-substituted glycans among species and discovery of novel chito-oligomers.** *J Biol Chem.*, 274(30):20953-60.
- HASLAM, S.M.; COLES, G.C.; MORRIS, H.R.; DELL, A. (2000). **Structural characterization of the N-glycans of Dictyocaulus viviparus: discovery of the Lewis(x) structure in a nematode.** *Glycobiology*, 10(2):223-9.
- HASLAM, S.M.; MORRIS, H.R.; DELL, A. (2001). **Mass spectrometric strategies: providing structural clues for helminth glycoproteins.** *TRENDS in parasitol.*, 17(5): 231-235.
- HASLAM, S.M.; RESTREPO, B.I.; ÓBREGÓN-HENAO, A.; TEALE, J.M.; MORRIS, H.R.; DELL, A. (2003). **Structural characterization of the N-linked glycans from Taenia solium metacestodes.** *Mol & Bioch Paras.*, 126: 103-7.
- HELENIUS, A.; AEBE, M. (2001). **Intracellular functions of N-linked glycans.** *Science.* 291: 2364-2369.
- HENDEL, T.M.; JOHNSON, Z.; GOUN, S.E.; LAU, E.K.; PROUDFOOT, A.E. (2005). **Regulation of protein function by glycosaminoglycans as exemplified by chemokines.** *Annu. Rev. Biochem.*, 74: 385-410.

- HIRABAYASHI, J. (2004). **Lectin-based structural glycomics: Glycoproteomics and glycan profiling.** *Glycoconj J.* 4(21):35–40.
- HOKKE, C.H.; DEELDER, A.M.; HOFFMANN, K.F.; WUHRER, M. (2007). **Glycomics-driven discoveries in schistosome research.** *Exp Parasitol.*, 117:275–83.
- HOKKE, C.H.; DEELDER, A.M. (2001). **Schistosome glycoconjugates in host-parasite interplay.** *Glycoconj J.*, 18(8):573-87.
- HSU, K.L.; PILOBELLO, K.T.; MAHAL, L.K. (2006). **Analyzing the dynamic bacterial glycome with a lectin microarray approach.** *Nat. Chem. Biol.* 2:153–57.
- HÜLSMEIER, A.J.; GEHRIG, P.M.; GEYER, R.; SACK, R.; GOTTSTEIN, B.; DEPLAZES, P.; KÖHLER, P. (2002). **A major *Echinococcus multilocularis* antigen is a mucin-type glycoprotein.** *J Biol Chem.*, 277(8):5742-8.
- HWANG, K.P.; CHEN, E.R. (1991). **Clinical studies on angiostrongyliasis cantonensis among children in Taiwan.** *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 22(1): 194-199.
- ILG, T.; STIERHOF, Y.D.; MCCONVILLE, M.J.; OVERATH, P. (1995). **Purification, partial characterization and immunolocalization of a proteophosphoglycan secreted by *Leishmania mexicana* amastigotes.** *J. Cell Biol.*, 66: 205-215.
- INGOLD, K.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILLM A. (2000). **High molecular mass glycans are major structural elements associated with the laminated layer of in vitro cultivated *Echinococcus multilocularis* metacestodes.** *Int J Parasitol.*, 30:207– 214.
- INTAPAN, P.M.; MALEEWONG, W.; POLSAN, Y.; SAWANYAWISUTH, K.; CHOTMONGKOL, V. (2002). **Specific IgG antibody subclasses to *Angiostrongylus cantonensis* in patients with angiostrongyliasis.** *Asian Pac J Allergy Immunol*, 20:235-240
- INTAPAN, P.M.; MALEEWONG, W.; SAWANYAWISUTH, K.; HOTMONGKOL, V.. (2003). **Evaluation of human IgG subclass antibodies in the serodiagnosis of angiostrongyliasis.** *Parasitology Research*, 89 (6): 425-429.

ISHIDA, M.M.; RUBINSKY-ELEFANT, G.; FERREIRA, A.W.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; VAZ, A.J. (2003). **Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and cross-reactivities in human infections and immunized animals.** *Acta Trop.*, 89(1):73-84.

ITO, Y.; MATSUO, I. (2003). **Carbohydrate-based Drug Discovery;** Wong C.-H., ed.; Wiley- VCH: Weinheim: 1, cap. 9.

JACOBS, W.; DEELDER, A.; VAN MARCK, E. (1999). **Schistosomal granuloma modulation. II. Specific immunogenic carbohydrates can modulate schistosome-egg-antigen-induced hepatic granuloma formation.** *Parasitol Res.*,85(1):14-8.

JAGDELE, G.B.; GREWAL, P.S. (2003). **Acclimation of entomopathogenic nematodes to novel temperature: trehalose accumulation and the acquisition of thermotolerance.** *International J. of Parasitol.*, 33: 145-152.

JANG-LEE, J.; DISSANAYAKE, S.; PANICO, M.; MORRIS, H.R.; DELL, A.; HASLAM, S.M. (2005). **Mass spectrometric characterization of *Taenia crassiceps* metacestode N-glycans.** *Mol Biochem Parasit.*, 143: 245-9.

JANG-LEE, J.; CURWEN, R.S.; ASHTON, P.D.; TISSOT, B.; MATHIESON, W.; PANICO, M.; DELL, A.; WILSON, R.A.; HASLAM, S.M. (2007). **Glycomics analysis of *Schistosoma mansoni* egg and cercarial secretions.** *Mol Cell Proteomics.*, 6:1485–1499.

JAROONVESAMA, N. (1988). **Differential diagnosis of eosinophilic meningitis.** *Parasitol Today*, 4: 262-6.

JASMER, D.P.; MCGUIRE, T.C. (1991). **Protective immunity to a blood-feeding nematode (*Haemonchus contortus*) induced by parasite gut antigens.** *Infect Immun.*, 59(12):4412-7.

JASMER, D.P.; PERRYMAN, L.E.; CONDER, G.A.; CROW, S.; MCGUIRE, T. (1993). **Protective immunity to *Haemonchus contortus* induced by immunoaffinity isolated antigens that share a phylogenetically conserved carbohydrate gut surface epitope.** *J Immunol.* , 151(10):5450-60.



- JIN, E.; MA, D.; LIANG, Y.; JI, A.; GAN, S. (2005). **MRI findings of eosinophilic myelomeningoencephalitis due to *Angiostrongylus cantonensis***. *Clin Radiol*, 60: 242-50.
- KANTELHARDT, S.R.; WUHRER, M.; DENNIS, R.D.; DOENHOFF, M.J.; BICKLE, Q.; GEYER, R. (2002). **Fuc( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3)GalNAc-: the major antigenic motif of *Schistosoma mansoni* glycolipids implicated in infection sera and keyhole-limpet haemocyanin cross-reactivity**. *Biochem J*, 366(Pt 1):217-23.
- KAPSENBERG, M.L. (2003). **Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization**. *Nat Rev Immunol*. 3:984–993.
- KHAN, A.H.; QAZI, A.M.; HOESSLI, D.C.; TORRED-DUARTE, A.P.; SENALDI, G.; QAZI, M.H.; WALKER-NASIR, E. (1997) **Carbohydrate moiety of *Plasmodium falciparum* glycoproteins: the nature of the carbohydrates-peptide linkage in the MSP-2 glycoprotein**. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 42: 655-668.
- KO, A.I.; DRÄGER, U.C.; HARN, D.A. (1990). **A *Schistosoma mansoni* epitope recognized by a protective monoclonal antibody is identical to the stage-specific embryonic antigen 1**. *Proc Natl Acad Sci.*, 87(11):4159-63.
- KOO, J.; PIEN, F.; KLIKS, M.M. (1988). ***Angiostrongylus (Parastrongylus) eosinophilic meningitis***. *Rev Infect Dis*, 10: 1155-1162.
- KHOO, K.H.; MAIZELS, R.M.; PAGE, A.P.; TAYLOR, G.W.; RENDELL, N.B.; DELL, A. (1991) **Characterization of nematode glycoproteins: the major O-glycans of *Toxocara* excretory-secretory antigens are O-methylated trisaccharides**. *Glycobiology.*, 1(2):163-71.
- KHOO, K.H.; SARDA, S.; XU, X.; CAULFIELD, J.P.; MCNEIL, M.R.; HOMANS, S.W.; MORRIS, H.R.; DELL, A. (1995). **A unique multifucoylated -3GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\alpha$ 1-motif constitutes the repeating unit of the complex O-glycans derived from the cercarial glycocalyx of *Schistosoma mansoni***. *J Biol Chem.*, 270:17114– 17123.

- KHOO, K.H.; NIETO. A.; MORRIS. H.R.; DELL. A. (1997a). **Structural characterization of the N-glycans from *Echinococcus granulosus* hydatid cyst membrane and protoscoleces.** *Mol Biochem Parasitol.*, 86:237–248. No texto
- KHOO, K.H.; CHATTERJEE. D.; CAULFIELD, J.P.; MORRIS, H.R.; DELL, A. (1997b). **Structural mapping of the glycans from the egg glycoproteins of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*: identification of novel core structures and terminal sequences.** *Glycobiology.*, 7(5):663-77. tabela
- KHOO, K.H.; DELL, A. (2001). **Glycoconjugates from parasitic helminths: Structure diversity and immunobiological implications.** *Adv Exp Med Biol.*, 491:185– 205
- KUBERSKI, T.; WALLACE, G.D. (1979). **Clinical manifestations of eosinophilic meningitis due to *Angiostrongylus cantonensis*.** *Neurology*, 29: 1566-1570.
- KUBERSKI, T.; BART, R.D.; BRILEY, J.M.; ROSEN, L. (1979). **Recovery of *Angiostrongylus cantonensis* from cerebrospinal fluid of a child with eosinophilic meningitis.** *J Clin Microbiol*, 9: 629–631.
- LAI, S.C. (2006). **Chinese herbal medicine yin-chen-extract as an adjunct to anthelmintic albendazole used against *Angiostrongylus cantonensis* induced eosinophilic meningitis or meningoencephalitis.** *Am J Trop Med Hyg.*, 75:556-562.
- LEONE, S.; de MARCO, M.; GHIRGA, P.; NICASTRI, E.; ESPOSITO, M.; NARCISO, P. (2007). **Eosinophilic meningitis in a returned traveler from Santo Domingo: case report and review.** *J Travel Med.*, 14: 407–410.
- LIMA, A.R.M.C.; MESQUITA, S.D.; SANTOS, S.S.; AQUINO, E.R.P.; ROSA, L.R.S.; DUARTE, F.S.; TEIXEIRA, A.O.; COSTA, Z.R.S.; FERREIRA, M.L.B. (2009). **Neuroinfestation by *Angiostrongylus cantonensis* in Recife, Pernambuco, Brazil.** *Arq Neuropsiquiatr*, 64(4):1093-1096.
- LIMA, L.K.; MASSARA, C.L.; SOUZA, D.E.C.P.; VIDIGAL, T.D.; LENZI, H.; CARVALHO, O.S. (1992). **Susceptibilidade de planorbídeos da região metropolitana de Belo Horizonte, MG (Brasil) ao *Angiostrongylus costaricensis* (NEMATODA ANGIOSTRONGYLIDAE).** *Rev Inst Med Trop*, 34 (5): 399-402.

LINEHAN, S.A.; COULSON, P.S.; WILSON, R.A.; MOUNTFORD, A.P.; BROMBACHER, F.; MARTINEZ-POMARES, L.; GORDON, S. (2003). **Il-4 receptor signaling is required for mannose receptor expression by macrophages recruited to granulomata but not resident cells in mice infected with *Schistosoma mansoni***. *Lab Invest.*, 83:1223–1231.

LINDO, J.F.; ESCOFFERY, C.T.; REID, B.; CODRINGTON, G.; CUNNINGHAM-MYRIE, C.; EBERHARD, M.L. (2004). **Fatal autochthonous eosinophilic meningitis in a Jamaican child caused by *Angiostrongylus cantonensis***. *Am J Trop Med Hyg.*, 70: 425-428.

LOCHNIT, G.; NISPEL, S.; DENNIS, R.D.; GEYER, R. (1998). **Structural analysis and immunohistochemical location of two glycosphingolipids from the porcine parasitic nematode *Ascaris suum***. *Glycobiology*, 8: 891-899.

MALEK, E.A.; CHENG, T.C. (1974). **Medical and economic malacology**. *Academic Press*. New York.

MALDONADO, A.J.R.; SIMÕES, R.O.; OLIVEIRA, A.P.; MOTTA, E.M.; FERNANDEZ, M.A.; PEREIRA, Z.M.; MONTEIRO, S.S.; TORRES, E.J.; THIENGO, S.C. (2010). **First report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) in *Achatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) from Southeast and South Brazil**. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 105(7):938-41.

MARSHALL, R.D. (1974). **The nature and metabolism of the carbohydrate-peptide linkage of glycoproteins**. *Biochem Soc. Symp.*, 40, 17-26.

MARTINEZ-POMARES, L.; LINEHAN, S.A.; TAYLOR, P.R.; GORDON, S. (2001). **Binding properties of the mannose receptor**. *Immunobiology.*, 204:527–535.

MEDEIROS, A.; CHIRIBAO, M.L.; UBILLOS, L.; FESTARI, M.F.; SALDANA, J.; ROBELLO, C.; DOMINGUEZ, L.; CALVETE, J.J.; OSINAGA, E. (2008). **Mucin-type O-glycosylation in *Mesocestoides vogae* (syn. Corti)**. *Int J Parasitol.* 38:265–276.

MEDVEDOVÁ, L.; FARKAS, R. (2004). **Hormonal control of protein glycosylation role of steroids and related lipophilic ligands**. *Endocr. Regul.*, 39: 65-79.

MEYER-WENTRUP, F.; CAMBI, A.; JOOSTEN, B.; LOOMAN, M.W.; DE VRIES, I.J.; FIGDOR, C.G.; ADEMA, G.J. (2009). **DCIR is endocytosed into human dendritic cells and inhibits TLR8-mediated cytokine production.** *J Leukoc Biol.*, 85:518–525.

MOODY-HAUPT, S.; PATTERSON, J.H.; MIRELMAN, D.; MCCONVILLE, M.J. (2000). **The major surface antigens of *Entamoeba histolytica* trophozoites are GPI-anchored proteophosphoglycans.** *J Mol Biol.*, 297(2):409-20.

MORASSUTTI, A.L.; LEVERT, K.; PERELYGIN, A.; DA SILVA, A.J.; WILKINS, P.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. (2012). **The 31-kDa Antigen of *Angiostrongylus cantonensis* Comprises Distinct Antigenic Glycoproteins.** *Vector-Borne and Zoonotic Dis.* 12 (11): 961-968.

MORASSUTTI, A.L.; LEVERT, K.; PINTO, P.M.; DA SILVA, A.J.; WILKINS, P.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. (2012b). **Characterization of *Angiostrongylus cantonensis* excretory-secretory proteins as potential diagnostic targets.** *Exp. Parasitol.*, 130(1):26-31.

MORASSUTTI, A.L.; PERELYGIN, A.; LEVERT, K.; LIN, S.C.; LEE, Y.M.; DA SILVA, A.J.; WILKINS, P.P.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. (2013). **Expression of recombinant antigenic proteins from *Angiostrongylus cantonensis*: a brief report.** *Hawaii J Med Public Health*, 72 (Suppl. 2): 58-62.

MORASSUTTI, A.L.; THIENGO, S.C.; FERNANDEZ, M.; SAWANYAWISUTH, K.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. (2014). **Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: an emergent disease in Brazil.** *Mem Inst Osw Cruz*, 109(4): 399-407.

MORELLE, W.; HASLAM, S.M.; OLIVIER, V.; APPLETON, J.A.; MORRIS, H.R.; DELL, A. (2000). **Phosphorylcholine-containing N-glycans of *Trichinella spiralis*: Identification of multiantennary LacDiNAc structures.** *Glycobiology.* 10:941–950.

MORTON, N.J.; BRITTON, P.; PALASANTHIRAN, P.; BYE, A.; SUGO, E.; KESSON, A.; ARDERN-HOLMES, S.; SNELLING, T.L. (2013). **Severe hemorrhagic meningoencephalitis due to *Angiostrongylus cantonensis* among young children in Sydney, Australia.** *Clin Infect Dis.*, 57(8):1158-61.

MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.G.; MAYES, P.A.; HARPER, V.W. (2002). **Bioquímica**. 9. ed. São Paulo: *Atheneu*, Pág 675-694.

NAKAGAKI, K.; NOGAMI, S.; HAYASHI, Y.; HAMMERBERG, B.; TANAKA, H.; OHISHI, I. (1993). ***Dirofilaria immitis*: detection of parasite-specific antigen by monoclonal antibodies in glomerulonephritis in infected dogs.** *Parasitol Res.*, 79(1):49-54.

NOMURA, S.; LIN, H. (1945). **First clinical case of *Hemostrongylus ratti*.** *J. Trop. Med. Hyg.*, 13: 589-590.

NORDEN, AP.; STRAND, M. (1985). **Identification of antigenic *Schistosoma mansoni* glycoproteins during the course of infection in mice and humans.** *Am J Trop Med Hyg.* , 34(3):495-507.

NUAMTANONG, S. (1996). **The evaluation of the 29 and 31 kDa antigens in female *Angiostrongylus cantonensis* for serodiagnosis of human angiostrongyliasis.** *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 27 (2): 291-296.

NYAME, A.K.; DEBOSE-BOYD, R.; LONG, T.D.; TSANG, V.C.; CUMMINGS, R.D. (1998). **Expression of Lex antigen in *Schistosoma japonicum* and *S.haematobium* and immune responses to Lex in infected animals: lack of Lex expression in other trematodes and nematodes.** *Glycobiology*. 8(6):615-24.

NYAME, A.K.; YOSHINO, T.P.; CUMMINGS, R.D. (2002). **Differential expression of Lac-DiNAc, fucosylated LacDiNAc, and Lewis X glycan antigens in intramolluscan stages of *Schistosoma mansoni*.** *J Parasitol.*, 88:890–897.

NYAME, A.K.; LEWIS, F.A.; DOUGHTY, B.L.; CORREA-OLIVEIRA, R.; CUMMINGS, R.D. (2003). **Immunity to schistosomiasis: Glycans are potential antigenic targets for immune intervention.** *Exp Parasitol.*, 104:1–13.

NYAME, A.K.; KAWAR, Z.S.; CUMMINGS, RD. (2004). **Antigenic glycans in parasitic infections: implications for vaccines and diagnostic.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 426:182-200.

- O'CONNOR, R.M.; KIM, K.; KHAN, F.; WARD, H.D. (2003). **Expression of Cpgp40/15 in *Toxoplasma gondii*: a surrogate system for the study of *Cryptosporidium* glycoprotein antigens.** *Infect Immun.*, 71(10):6027-34.
- OKANO, M.; SATOSKAR, A.R.; NISHIZAKI, K.; ABE, M.; HARN, D.A. Jr. (1999). **Induction of Th2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on *Schistosoma mansoni* egg antigens.** *J. Immunol.*, 163: 6712-17.
- OKANO, M.; SATOSKAR, A.R.; NISHIZAKI, K.; HARN, D.A. JR. (2001). **Lacto-N-fucopentaose III found on *Schistosoma mansoni* egg antigens functions as adjuvant for proteins by inducing Th2-type response.** *J Immunol.*, 167:442–450.
- OTTO, T.D.; GUIMARÃES, A.C.; DEGRAVE, W.M.; DE MIRANDA, A.B. (2008). **AnEnPi: identification and annotation of analogous enzymes.** *BMC Bioinformatics.* 9: 544.
- PAPANASTASIOU, P.; MCCONVILLE, M.L.; RALTON, J.; KOHLER, P. (1997). **The variant-specific surface protein of *Giardia*, VSP4A1, is a glycosylated and palmitoylated protein.** *Biochem. J.*, 322: 49-56.
- PASCHINGER, K.; HACKL, M.; GUTTERNIGG, M.; KRETSCHMER-LUBICH, D.; STEMMER, U.; JANTSCH, V.; LOCHNIT, G.; WILSON, I.B. (2006). **A deletion in the golgi alpha-mannosidase II gene of *Caenorhabditis elegans* results in unexpected non-wild-type N-glycan structures.** *J Biol Chem.*, 281(38):28265-77.
- PASCHINGER, K.; GONZALEZ-SAPIENZA, G.G.; WILSON, I.B. (2012). **Mass spectrometric analysis of the immunodominant glycan epitope of *Echinococcus granulosus* antigen Ag5.** *Int J Parasitol.*, 42(3):279-85.
- PASCHINGER, K.; HYKOLLARI, A.; RAZZAZI-FAZELI, E.; GREENWELL, P.; LEITSCH, D.; WALOCHNIK, J.; WILSON, L.B.H. (2012b) **The N-Glycans of *Thichomonas vaginalis* contain variable core and antennal modifications.** *Glycobiology.* , 22(2): 300–313.
- PATSOS, G.; CORFIELD, A. (2009). **Management of the human mucosal defensive barrier; evidence for glycan legislation,** *Biol. Chem.*, 390: 581–590.

PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L.; COSTA, F.; RIBEIRÃO, M.; SOARES, I.S.; ARENA, F.; SCHENKMAN, S.; RODRIGUES, M.M. (1999). **Comparison of antibody and protective immune responses against *Trypanosoma cruzi* infection elicited by immunization with a parasite antigen delivered as naked DNA or recombinant protein.** *Parasite Immunol.*, 21(2):103-10.

PETERSON, N.A.; HOKKE, C.H.; DEELDER, A.M.; YOSHINO, T.P. (2009). **Glycotope analysis in miracidia and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*: Differential expression during the miracidium-to-sporocyst transformation.** *Int J Parasitol.*, 39:1331–1344.

PETRI, W.A. JR. (1996). **Recent advances in amebiasis.** *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 33: 1-37.

PIEN, F.D.; PIEN, B.C. (1999). ***Angiostrongylus cantonensis* Eosinophilic Meningitis.** *Intern J Infect Dis.*, 3(3): 61-163.

PINCAI, T.; GARCÍA, L.; NARVÁEZ, E.; DECKER, O.; MARTINI, L.; MOREIRA, J.M. (2009). **Angiostrongyliasis due to *Parastrongylus (Angiostrongylus) cantonensis* in Ecuador. First report in South America.** *Tropical Medicine and International Health*, 14 (2):37.

POLTL, G.; KERNER, D.; PASCHINGER, K.; WILSON, I.B. (2007). **N-Glycans of the porcine nematode parasite *Ascaris suum* are modified with**

PREVIATO, J.O.; GORIN, P.A.J.; MAZUREK, M.; XAVIER, M.T.; FOURNET, B.; WIERUSZESK, J.M.; MENDONCA-PREVIATO, L. (1990). **Primary structure of the oligossacharide chain of lipopeptidophosphoglycan of the epimastigote form of *Trypanosoma cruzi*.** *J. Biol. Chem.*, 265: 2518-2526.

PRIEST, J.W.; MEHLERT, A.; ARROWOOD, M.J.; RIGGS, M.W.; FERGUSON, M.A. (2003). **Characterization of a low molecular weight glycolipid antigen from *Cryptosporidium parvum*.** *J Biol Chem.*, 278(52):52212-22.

PUNYAGUPTA, S.; JUTTIJUDATA, P.; BUNNAG, T. (1975). **Eosinophilic meningitis in Thailand. Clinical studies of 484 typical cases probably caused by *Angiostrongylus cantonensis*.** *Am J Trop Med Hyg.*, 24: 921-931.

QVARNSTROM, Y.; DA SILVA, A.C.; TEEM, J.L.; HOLLINGSWORTH, R.; BISHOP, H.; GRAEFF-TEIXEIRA, C.; DA SILVA, A.J. (2010). **Improved molecular detection of *Angiostrongylus cantonensis* in mollusks and other environmental samples with a species-specific internal transcribed spacer 1-based TaqMan assay.** *Appl Environ Microbiol.*, 76: 5287-5289.

REASON, A.J.; ELLIS, L.A.; APPLETON, J.A.; WISNEWSKI, N.; GRIEVE, R.B.; MCNEIL, M.; WASSOM, D.L.; MORRIS, H.R.; DELL, A. (1994). **Novel tyvelose-containing tri- and tetra-antennary N-glycans in the immunodominant antigens of the intracellular parasite *Trichinella spiralis*.** *Glycobiology*. 4:593–603.

RESTREPO, B.I.; OBREGÓN-HENAO, A.; MESA, M.; GIL, D.L.; ORTIZ, B.L.; MEJÍA, J.S.; VILLOTA, G.E.; SANZÓN, F.; TEALE, J.M. (2000). **Characterisation of the carbohydrate components of *Taenia solium* metacestode glycoprotein antigens.** *Int J Parasitol.* 30(6):689-96.

ROBLES, M.R.; NAVONE, G.T.; KINSELLA, J.M. (2008). **A new angiostrongylid (Nematoda) species from the pulmonary arteries of *Akodon azarae* (Rodentia: Cricetidae) in Argentina.** *J Parasitol.*, 94(2):515-519.

ROMASANTA, A.; ROMERO, J.L.; ARIAS, M.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; LÓPEZ, C.; SUÁREZ, J.L.; DÍAZ, P.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONGO, P.; PAZ-SILVA, A. (2003). **Diagnosis of parasitic zoonoses by immunoenzymatic assays--analysis of cross-reactivity among the excretory/secretory antigens of *Fasciola hepatica*, *Toxocara canis*, and *Ascaris suum*.** *Immunol Invest.*, 32(3):131-42.

RUSSELL, D.G.; ALEXANDER, J. (1988). **Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes.** *J Immunol.*, 140(4):1274-9.

SAWANYAWISUTH, K.; TAKAHASHI, K.; HOSHUYAMA, T.; SENTHONG, V.; LIMPAWATTANA, P.; INTAPAN, P.M.; WILSON, D.; TIAMKAO, S.; JITPIMOLMARD, S.; CHOTMONGKOL, V. (2009). **Clinical factors predictive of encephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*.** *Am J Trop Med Hyg.*, 81: 698-701.



- SAWANYAWISUTH, K.; SAWANYAWISUTH, K. (2010). **Drug target in eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis***. *Infect Disord Drug Targets*, 10: 322-328.
- SAWANYAWISUTH, K.; SAWANYAWISUTH, K.; INTAPAN, P.M.; ET AL. (2011). **Specificity of immunoblotting analyses in eosinophilic meningitis**. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106:570-572.
- SCHMIDT, M.A.; RILY, L.M.; BENZ, I. (2003). **Swett new world: glycoproteins in bacterial of pathogens**. *Trends Microbiol.*, 11: 554-61
- SCHOFIELD, L.; MCCONVILLE, M.J.; HANSEN, D.; CAMPBELL, A.S.; FRASER-REID, B.; GRUSBY, M.J.; TACHADO, S.D. (1999). **CD1d-restricted immunoglobulin G formation to GPI-anchored antigens mediated by NKT cells**. *Science.*, 283(5399):225-9.
- SCHOFIELD, L.; HEWITT, M.C.; EVANS, K.; SIOMOS, M.A.; SEEBERGER, P.H. (2002). **Synthetic GPI as a candidate anti-toxic vaccine in a model of malaria**. *Nature*, 418(6899):785-9.
- SEARS, P.; WONG, C.H. (1998). **Enzyme action in glycoprotein synthesis**. *Cell Mol. Life Sci.* 54: 223-252.
- SHER, A.; PEARCE, E.; KAYE, P. (2003). **Shaping the immune response to parasites: role of dendritic cells**. *Curr Opin Immunol.*,15(4):421-9.
- SHIH, H.H.; CHEN, S.N. (1991). **Immunodiagnosis of angiostrongyliasis with monoclonal antibodies recognizing a circulating antigen of mol. wt 91,000 from *Angiostrongylus cantonensis***. *Int J Parasitol.*, 21: 171-177.
- SINGH, B.N.; HAYES, G.R.; LUCAS, J.J.; LEVERY, S.B.; MIRGORODSKAYA, K.; COSTELLO, C.E. (2000). **Novel lopophosphoglycans of trichomonad parasites**. *Glycobiology*. 10: 1127.
- SLAWSON, C.; HOUSLEY, M.P.; HART, G.W. (2006). **O-GlcNAc cycling: how a single sugar post-translational modification is changing the way we think about signaling networks**. *J. Cell. Biochem.*, 97, 71–83.

SLOM, T.J.; CORTESE, M.M.; GERBER, S.I. (2002). **An outbreak of eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in travelers returning from the Caribbean.** *N. Engl. J. Med.*, 346: 668–675.

SOLÍS, D.; BOVIN, N.V.; DAVIS, A.P.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; ROMERO, A.; ROY, R.; SMETANA, K. JR.; GABIUS, H.J. (2015). **A guide into glycosciences: How chemistry, biochemistry and biology cooperate to crack the sugar code.** *Biochim Biophys Acta*.1850(1):186-235.

SOTILLO, J.; CÓRTEZ, A.; MUNOZ-ANTOLI, C.; FRIED, B.; ESTEBAN, J.G.; TOLEDO, R. (2014). **The effect of glycosylation of antigens on the antibody responses against *Echinostoma caproni* (Trematoda: Echinostomatidae).** *Parasit.*,141: 1333-340.

SPIRO, R.G. (2002). **Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation and disease implications of glycopeptides bonds.** *Glycobiology*. 12: 43R-56R.

SRIVATSAN, J.; SMITH, D.F.; CUMMINGS, R.D. (1992). **The human blood fluke *Schistosoma mansoni* synthesizes glycoproteins containing the Lewis X antigen.** *J Biol Chem.*, 267(28):20196-203.

SRIVATSAN, J.; SMITH, D.F.; CUMMINGS, R.D. (1992b). ***Schistosoma mansoni* synthesizes novel biantennary Asn-linked oligosaccharides containing terminal beta-linked N-acetylgalactosamine.** *Glycobiology*. (5):445-52.

STANLEY, S.L.; TIAN, K.; KOESTER, J.P.; LI, E. (1995). **The serine rich *Entamoeba histolytica* protein is a phosphorylated membrane protein containing O-linked terminal N-acetylglucosamine residues.** *J. Biol. Chem.*. 270: 4121-26.

TALABNIN, K.; AOKI, K.; SAICHUA, P.; WONGKHAM, S.; KAEWKES, S.; BOONS, G.J.; SRIPA, B.; TIEMEYER, M. (2013). **Stage-specific expression and antigenicity of glycoprotein glycans isolated from the human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*.** *Int J Parasitol.*, 43(1):37-50.

- TARATUTO, A.L.; VENTURIELLO, S.M. (1997). **Echinococcosis**. *Brain Pathol.*, 7(1):673-9.
- THANKA CHRISTLET, T.H.; VELURAJA, K. (2001). **Database analysis of O-glycosylation sites in proteins**. *Biochem. J.* 80: 952-60.
- THIENGO, S.C.; MALDONADO, A.; MOTA, E.M.; TORRES, E.J.; CALDEIRA, R.; *et al.* (2010). **The giant African snail *Achatina fulica* as natural intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* in Pernambuco, Northeast Brazil**. *Acta Trop.*, 115: 194-199.
- THOMAS P.G.; HARN, D.A. JR. (2004). **Immune biasing by helminth glycans**. *Cell Microbiol.*, 6:13–22.
- TODESCHINI, A.R.; DA SILVEIRA, E.X.; JONES, C.; WAIT, R.; PREVIATO, J.O.; MENDONÇA-PREVIATO, L. (2001). **Structure of O-glycosidically linked oligosaccharides from glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* CL-Brener strain: evidence for the presence of O-linked sialyl-oligosaccharides**. *Glycobiology*. 11(1):47-52
- TONUI, W.K.; MBATI, P.A.; ANJILI, C.O.; ORAGO, A.S.; TURCO, S.J.; GITHURE, J.I.; KOECH, D.K. (2001). **Transmission blocking vaccine studies in leishmaniasis: I. Lipophosphoglycan is a promising transmission blocking vaccine molecule against cutaneous leishmaniasis**. *East Afr Med J.*, 78(2):84-9.
- TSAI, H.C.; LIU, Y.C.; KUNIN, C.M.; LEE, S.S.; CHEN, Y.S.; LIN, H.H.; TSAI, T.H.; LIN, W.R.; HUANG, C.K.; YEN, M.Y.; YEN, C.M. (2001). **Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: report of 17 cases**. *Am. J. Med.*, 111: 109–114.
- TSAI, H.C.; LIU, Y.C.; KUNIN, C.M.; LAI, P.H.; LEE, S.S.; CHEN, Y.S. (2003). **Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* associated with eating raw snails: correlation of brain magnetic resonance imaging scans with clinical findings**. *Am J Trop Med Hyg*, 68: 281-5.
- UBELAKER, J.E.; CARUSO, J.; PEÑA, A. (1981). **Experimental infection of *Sigmodon hispidus* with third-stage larvae of *Angiostrongylus costaricensis***. *J. Parasitol.* 67 (2): 219-221.

UBILLOS, L.; MEDEIROS, A.; CANCELA, M.; CASARAVILLA, C.; SALDANA, J.; DOMÍNGUEZ, L.; CARMONA, C.; LE PENDU, J.; OSINAGA, E. (2007). **Characterization of the carcinoma associated Tk antigen in helminth parasites.** *Exp Parasitol*, 116: 129-136.

VAN DAM, G.J.; BERGWERFF, A.A.; THOMAS-OATES, J.E.; ROTMANS, J.P.; KAMERLING, J.P.; Vliegenthart, J.F.; DEELDER, A.M. (1994). **The immunologically reactive O-linked polysaccharide chains derived from circulating cathodic antigen isolated from the human blood fluke *Schistosoma mansoni* have Lewis x as repeating unit.** *Eur J Biochem.*, 225(1):467-82.

VAN DEN EIJDEN, D.H.; NEELEMAN, A.P.; BAKKER, H.; VAN DIE, I. (1998). **Novel pathways in complex-type oligosaccharide synthesis. New vistas opened by studies in invertebrates.** *Adv Exp Med Biol.*, 435:3–7.

VAN DIE, I.; GOMORD, V.; KOOYMAN, F.N.; VAN DEN BERG, T.; CUMMINGS, R.D.; VERVELDE, L. (1999). **Core  $\alpha$ 1-3-fucose is a common modification of N-glycans in parasitic helminths and constitutes an important epitope for IgE from *Haemonchus contortus* infected sheep.** *FEBS Lett.* 463:189– 193.

VAN DIE, I.; CUMMINGS, R.D. (2006). **Glycans modulate immune responses in helminth infections and allergy.** *Chem Immunol Allergy.* 90:91–112.

VAN DIE, I.; CUMMINGS, R.D. (2010). **Glycan gimmickry by parasitic helminths: A strategy for modulating the host immune response?** *Glycobiology*, 20(1): 2–12.

VAN KOOYK, Y.; GEIJTENBEEK, T.B. (2003). **DC-SIGN: escape mechanism for pathogens.** *Nat Rev Immunol.*, 3(9):697-709.

VAN KOOYK, Y.; RABINOVICH, G.A. (2008). **Protein–glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses.** *Nat Immunol.*, 9:593–601.

VAN LIEMPT, E.; BANK, C.M.; MEHTA, P.; GARCIA-VALLEJO, J.J.; KAWAR, Z.S.; GEYER, R.; ALVAREZ, R.A.; CUMMINGS, R.D.; KOOYK, Y.; VAN DIE, I. (2006). **Specificity of DCSIGN for mannose- and fucose-containing glycans.** *FEBS Lett.*, 580:6123–6131.

VAN LIEMPT, E.; VAN VLIET, S.J.; ENGERING, A.; GARCIA VALLEJO, J.J.; BANK, C.M.; SANCHEZ-HERNANDEZ, M.; VAN KOOYK, Y.; VAN DIE, I. (2007). **Schistosoma mansoni** soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation. *Mol Immunol.*, 44: 2605–2615.

VAN REMOORTERE, A.; HOKKE, C.H.; VAN DAM, G.J.; VAN DIE, I.; DEELDER, A.M.; VAN DEN EIJNDEN, D.H. (2000). Various stages of schistosoma express Lewis(x), Lac-DiNAc, GalNAc $\beta$ 1-4 (Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc and GalNAc $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-2Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc carbohydrate epitopes: Detection with monoclonal antibodies that are characterized by enzymatically synthesized neoglycoproteins. *Glycobiology.* 10:601–609.

VAN REMOORTERE, A.; VAN DAM, G.J.; HOKKE, C.H.; VAN DEN EIJNDEN, D.H.; VAN DIE, I.; DEELDER, A.M. (2001). Profiles of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies against defined carbohydrate epitopes in sera of Schistosoma-infected individuals determined by surface plasmon resonance. *Infect Immun.*, 69(4):2396-401.

VAN REMOORTERE, A.; BANK, C.M.; NYAME, A.K.; CUMMINGS, R.D.; DEELDER, A.M.; VAN DIE, I. (2003). Schistosoma mansoni-infected mice produce antibodies that cross-react with plant, insect, and mammalian glycoproteins and recognize the truncated biantennaryN-glycan Man3GlcNAc2-R. *Glycobiology.*, 13(3):217-25.

VAN REMOORTERE, A.; VERMEER, H.J.; VAN ROON, A.M.; LANGERMANS, J.A.; THOMAS, A.W.; WILSON, R.A.; VAN DIE, I.; VAN DEN EIJNDEN, D.H.; AGOSTON, K.; KÉRÉKGYARTO, J.; Vliegenthart, J.F.; KAMERLING, J.P.; VAN DAM, G.J.; HOKKE, C.H.; DEELDER, A.M. (2003b). Dominant antibody responses to Fucalpha1-3GalNAc and Fucalpha1-2Fucalpha1-3GlcNAc containing carbohydrate epitopes in Pan troglodytes vaccinated and infected with Schistosoma mansoni. *Exp Parasitol.*, 105(3-4):219-25.

VAN VLIET, S.J.; VAN LIEMPT, E.; SAELAND, E.; AARNOUDSE, C.A.; APPELMELK, B.; IRIMURA, T.; GEIJTENBEEK, T.B.; BLIXT, O.; ALVAREZ, R.; VAN DIE, I.; ET AL. (2005). Carbohydrate profiling reveals a distinctive role for the C-

**type lectin MGL in the recognition of helminth parasites and tumor antigens by dendritic cells.** *Int Immunol.*, 17:661–669.

VERMEER, H.J.; VAN DAM, G.J.; HALKES, K.M.; KAMERLING, J.P.; Vliegenthart, J.F.; HOKKE, C.H.; DEELDER, A.M. (2003). **Immunodiagnostically applicable monoclonal antibodies to the circulating anodic antigen of *Schistosoma mansoni* bind to small, defined oligosaccharide epitopes.** *Parasitol Res.*, 90(4):330-6.

VERVELDE, L.; BAKKER, N.; KOOYMAN, F.N.; CORNELISSEN, A.W.; BANK, C.M.; NYAME, A.K.; CUMMINGS, R.D.; VAN DIE, I. (2003). **Vaccination-induced protection of lambs against the parasitic nematode *Haemonchus contortus* correlates with high IgG antibody responses to the LDNF glycan antigen.** *Glycobiology.* 13:795– 804.

WANG, L.C.; JUNG, S.M.; CHEN, C.C.; WONG, H.F.; WAN, D.P.; WAN, Y.L. (2006). **Pathological changes in the brains of rabbits experimentally infected with *Angiostrongylus cantonensis* after albendazole treatment: histopathological and magnetic resonance imaging studies.** *J Antimicrob Chemother*, 57: 294–300.

WANG, Q.P.; LAI, D.H.; ZHU, X.Q.; CHEN, X.G.; LUN, Z.R. (2008) **Human angiostrongyliasis.** *Lancet Infect Dis.*, 8: 621–30

WISNEWSKI, N.; MCNEIL, M.; GRIEVE, R.B.; WASSOM, D.L. (1993). **Characterization of novel fucosyl- and tyvelosyl-containing glycoconjugates from *Trichinella spiralis* muscle stage larvae.** *Mol Biochem Parasitol.*, 61:25–35.

WILEY-VCH, W. (2009). **The Sugar Code: Fundamentals of Glycosciences.** Edited by Hans-Joachim Gabius. 569 pp.

WUHRER, M.; RICKHOFF, S.; DENNIS, R.D.; LOCHNIT, G.; SOBOSLAY, P.T.; BAUMEISTER, S.; GEYER, R. (2000). **Phosphocholine-containing, zwitterionic glycosphingolipids of adult *Onchocerca volvulus* as highly conserved antigenic structures of parasitic nematodes.** *Biochem J.*, 348 Pt 2:417-23.

WUHRER, M.; GRIMM, C.; ZHRINGER, U.; DENNIS, R.D.; BERKEFELD, C.M.; IDRIS, M.A.; GEYER, R. (2003). **A novel GlcNAc $\alpha$ 1-HPO3-6Gal(1-1)ceramide**

antigen and alkylated inositol-phosphoglycerolipids expressed by the liver fluke *Fasciola hepatica*. *Glycobiology*, 13(2):129-37.

WUHRER, M.; GRIMM, C.; DENNIS, R.D.; IDRIS, M.A.; GEYER, R. (2004). The parasitic trematode *Fasciola hepatica* exhibits mammalian-type glycolipids as well as Gal(beta1-6)Gal-terminating glycolipids that account for cestode serological cross-reactivity. *Glycobiology*, 14(2):115-26.

WUHRER, M.; KOELEMAN, C.A.; DEELDER, A.M.; HOKKE, C.H. (2006). Repeats of LacDiNAc and fucosylated LacDiNAc on *N*-glycans of the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Febs J.*, 273:347–361.

YEN, C.M.; CHEN, E.R. (1991). Detection of antibodies to *Angiostrongylus cantonensis* in serum and cerebrospinal fluid of patients with eosinophilic meningitis. *Int J Parasitol.*, 21:17-21.

ZACHARA, N.E.; HART, G.W. (2004). O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress. *Biochim. Biophys. Acta*, 1673: 13–28.

## APPENDICES

### Apêndice A - Paper in Preparation 1: Characterization of the glycidic portion of the 31-kDa Antigen, the major antigen of *Angiostrongylus cantonensis*

#### Characterization of the glycidic portion of the 31-kDa Antigen, the major antigen of *Angiostrongylus cantonensis*

Carolina De Marco Veríssimo<sup>1,3,\*</sup>; Alessandra Loureiro Morassutti<sup>1</sup>; Alamgir Khan<sup>2</sup>; Lauren Hartley-Tassell<sup>3</sup>; Nicolle H. Packer<sup>4</sup>; Mark von Itsztein<sup>3</sup>; Carlos Graeff-Teixeira<sup>1</sup>

1- Laboratório de Parasitologia Molecular – Instituto de Pesquisas Biomédicas and Laboratório de Biologia Parasitária, Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Porto Alegre, RS 90060-900, Brazil.

2- Australian Proteome Analysis Facility, Macquarie University, Sydney, New South Wales, Australia.

3- Institute for Glycomics – Griffith University, Gold Coast Campus, Queensland 4222, Australia.

4- Faculty of Science, Biomolecular Frontiers Research Centre, Macquarie University, Sydney, New South Wales, Australia.

Corresponding author: Carolina De Marco Veríssimo. Laboratório de Parasitologia Molecular – Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). CEP: 90060-900, Brazil. Fax: (55)51- 3320-3353 Phone: (55)51-3320-3353 Ramal: 2170 E-mail: caroldmv@yahoo.com.br

**Key words:** *Angiostrongylus cantonensis* / Diagnosis / N-glycans / 31-kDa antigen



**Running Title:** Characterization of glycans of 31-kDa antigen

**Supplementary data:** Lectin array list

## **Abstract**

*Angiostrongylus cantonensis* is the main agent of eosinophilic meningitis, an emerging infectious disease in many parts of the world. Extensive studies shown that 31-kDa antigen from soluble crude extract of female *A. cantonensis* worms are appropriate for serological diagnosis of the infection. This antigen is composed by glycoproteins and tentative in producing these molecules in recombinant expression systems were unsuccessful in been recognized by infected sera, probably due the lack of glycans. Here we present the glycan composition of 31-kDa antigen and their respective role in the antigenicity. The recognition of the 31-kDa antigen by positive sera was abrogated after PNGase F treatment, demonstrating the importance of N-glycans for immune recognition. The LC-ESI-MS data showed that all three spots of 31-kDa antigen presented the same set of N-glycans, composed by truncated and high mannose structures. The same structures were also predicted by computational modeling of the 31-kDa glycoproteins. O-glycans signals were not observed in these analyses. The MS spectra of N-glycans presented glycans with very commum features among other parasites. In the lectin array analysis, positive binding was detected for 25 lectins, including to calsepa, MNA-M and VFA, which are lectins with affinity to mannose. Further analysis could The 31-kDa antigen is the main antigen used in the diagnosis of EM caused by *A. cantonensis*. The results presented here may contribute to produce recombinant proteins which could be applied into a standardized diagnostic test for worldwide distribution.

## **Introduction**

*Angiostrongylus cantonensis* is the main agent of causing eosinophilic meningitis (EM), an emerging infectious disease in many parts of the world (Wang *et al.*, 2008; Graeff-Teixeira *et al.*, 2009; Morassutti *et al.*, 2014). The life cycle of *A.*

*cantonensis* involves one definitive host, typically *Rattus norvegicus*, and one intermediate host, mollusks (Wang et al., 2008). Humans can be accidentally infected by ingesting infected mollusks or contaminated raw or undercooked foods containing the infective larval stage (L3), contaminated water or by accidental ingestion during hand manipulation of mollusks in fisheries and/or during garden upkeep (Morassutti et al., 2014), which may result in EM (Ali et al., 2008; Jitpimolmard et al., 2007).

The diagnosis of EM involves evaluating of clinical symptoms and laboratory tests. Larvae exposure within three months and evidence of eosinophilia of 10% of the total count of white blood cells in cerebral spinal fluid (CSF) are the main indicators (Ramirez-Avila et al., 2009, Sawanyawisuth et al., 2009). Definitive diagnosis, is based in finding of the parasite in CSF, but is rare that this occurs (Eamsobhana, 2006). Extensive studies have shown that 31-kDa antigen from soluble crude extract of female worm of *A. cantonensis* (TE) are appropriate for serological diagnosis of the infection, given their high sensibility and specificity (Nuamtanong, 1996; Eamsobhana and Yong, 2009; Morassutti et al., 2012).

Recently, Morassutti et al. (2012) identified the composition of 31-kDa antigen. The amino acid sequence data obtained shown that different proteins were present in immunologically recognized spots: 14-3-3 protein, a nascent polypeptide associated complex (NAC) and Epsilon coatamer subunit. Additionally authors observed that spots recognition were dependent of glycan moieties, since they were *m*-periodate sensible. Tentative in producing these molecules in recombinant expression systems were unsuccessful in been recognized by infected sera, even when eukaryotic system was employed (Morassutti et al., 2013). The lack of antigenicity of those *Angiostrongylus* recombinant proteins could be explained by the incorrect sequence, composition or incorporation of carbohydrate moiety during protein synthesis (Haslam et al., 2003; Nyame et al., 2004; Morassutti et al., 2013).

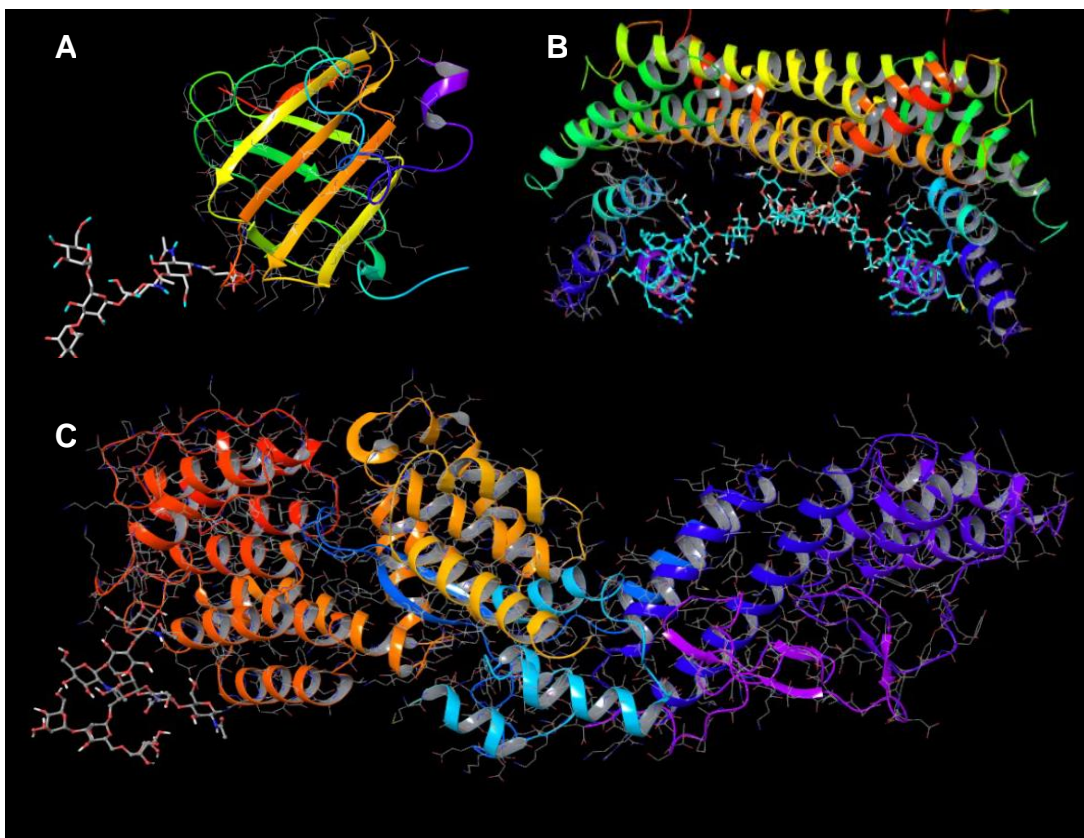
As the need of having a well-defined and large scale producible antigen, it is urgent better understanding of glycan moieties from the 31-kDa antigen of *A. cantonensis*. An initial project evaluated the composition of carbohydrate moieties from TE showing most of glycan are typical within helminths complex-type, high mannose and truncated glycan structures were identified by MS analyzes (Verissimo

*et al.*, 2015). Here we present the glycan composition of 31-kDa antigen and their respective role in the antigenicity.

## Results

### Computational analyse of the proteins present in the 31-kDa antigen

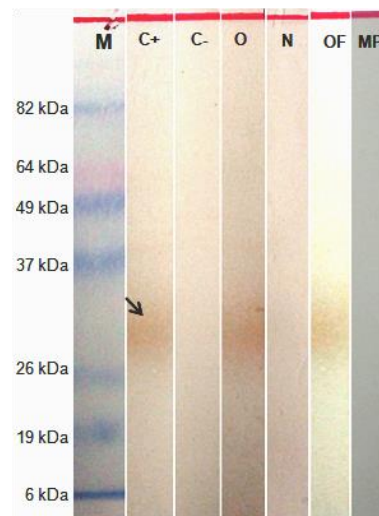
The computational analyse of the available peptide sequences of the NAC, 14-3-3 protein, and epsilon coatamer subunit proteins (Figure 1), which were previously identified as part of the *A. cantonensis* 31-kDa antigen, showed that all proteins have *N*-glycosylation sites among their structure.



**Figure 1.** *N*-glycosylation sites prediction of the A: Nascent polypeptide associated complex (NAC); B: 14-3-3 protein; C: Epsilon coatamer subunit, proteins present in the *A. cantonensis* 31-kDa antigen.

## ***N*-glycans are essential for immune recognition of the 31-kDa antigen of *A. cantonensis***

The 31-kDa antigen of *A. cantonensis* was enzymatically or chemically treated for glycan removal, by using either *N*-glycosidase (PNGase *F*), *O*-glycosidase, *O*-glycosidase associated with  $\alpha$ -L-Fucosidase or *m*-periodate. The recognition of the 31-kDa antigen by positive sera was abrogated when TE was *N*-deglycosylated (Figure 2). Same was observed when *m*-periodate was used for glycan oxidation.

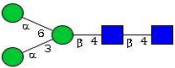
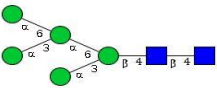


**Figure 2.** Immunogenicity of *N*-glycan from 31-kDa antigen. 31-kDa antigen (arrow) incubated with different glycan interfering: O: *O*-glycosidase; N: PNGase *F*; OF:  $\alpha$ -L-Fucosidase associated with *O*-glycosidase; MP: *m*-periodate. M: Marker; C+: pool of serum from *Angiostrongylus cantonensis* infected patients without any interfering; C-: Pool of serum from not infected individuals.

## **Structural analysis of *N*- and *O*-glycans from 31-kDa antigen of *A. cantonensis***

From the PVDF membrane three typical spots that correspond to 31-kDa were cut off and analyzed independently by mass spectrometry. LC-ESI-MS/MS data showed that fractions obtained from all three spots presented a very similar set of *N*-glycans. High mannose ( $\text{Hex}_{5-7}\text{HexNAc}_2$ ) and truncated structures ( $\text{Fuc}_{0-1}\text{Hex}_3\text{HexNAc}_2$ ) were present in all fractions (Table I). No *O*-glycans signals were identified in the samples.

**Table I.** *N*-glycan structures identified from *A. cantonensis* glycoproteins present in the 31-kDa antigen

Cartoon	<i>m/z</i>	Type	Glycan
<b>31 kDa spots</b>			
	911,4	Pauci	Man $\alpha$ 1-3(Man $\alpha$ 1-6)Man $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc
	1235,5	High Mannose	Man $\alpha$ 1-3(Man $\alpha$ 1-3Man $\alpha$ 1-6) Man $\alpha$ 1-6Man $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc

### Lectin binding signature of 31-kDa antigen from *A. cantonensis*

Table I presents all lectins that showed positive binding with 31-kDa antigen, glycan structure which interacts with each lectin, and affinity degree, based on the three lectin concentrations used in the array. From a total of 86 lectins, 25 presented positive binding with moderate or low affinity to glycoproteins of 31-kDa antigen. These lectins mainly bound glycan structures such Gal, GalNAc and Man. In this analysis, there were no lectins with high affinity.

**Table II.** Lectin binding signature of 31-kDa antigen from *A. cantonensis*

Lectin	Glycan affinity	Binding intensity
BPA	GalNAc $\alpha$ , Gala	
BS-I	Gala, GalNAc $\alpha$ (terminal)	
Calsepa	Man, Glc, Glc $\alpha$ 1-4Glc	
ECA	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc (Terminal)	
EEA	GalNAc $\beta$	

HPA	GalNAc $\alpha$ (Terminal)	Dark grey
LcH	Man/GlcNAc core with Fuc $\alpha$ <sub>1-6</sub>	Light grey
MNA-M	Man $\alpha$	Dark grey
MPA	Gal $\alpha$ , GalNAc $\alpha$	Dark grey
NPA	Man $\alpha$ ? Man $\beta$ ?	Light grey
PHA-L	Gal $\beta$ <sub>1-4</sub> GlcNAc $\beta$ <sub>1-2</sub> Man	Light grey
PTA GalNAc	GalNAc	Light grey
PWM	GlcNAc $\beta$ <sub>1-4</sub> GlcNAc	Light grey
RTA	Glc?	Dark grey
SHA	GalNAc	Light grey
SNA-II	Gal $\beta$ (Terminal), GalNAc $\beta$ (Terminal)	Light grey
SBA	GalNAc $\alpha$ (Terminal), Neu5Ac $\alpha$ <sub>2-6</sub> GalNAc (Tn antigen)	Light grey
SSA	GalNAc, Terminal, O-link	Dark grey
TKA	Gal $\beta$ , Gal $\beta$ <sub>1-4</sub> Glc (Lactose)	Dark grey
UDA	GalNAc $\beta$	Light grey
UEA-II	GlcNAc $\beta$ , Fuc $\alpha$ <sub>1-2</sub> Gal $\beta$ <sub>1-4</sub> GlcNAc	Light grey
VAA	Gal $\beta$	Dark grey
VFA	Man $\alpha$	Dark grey
WGA	Gal $\beta$ <sub>1-3</sub> GalNAc / (GlcNAc), NeuNAc	Light grey
LecA (PA-IL)	Gal	Light grey

Dark grey: moderate affinity lectin; Light grey: Low affinity lectin

## Discussion

Glycans play a crucial role in several aspects of the host-parasite relationship in helminthic infections that include the generation and modulation of the immune responses (Cummings and Nyame, 1999; Hokke and Deelder, 2001; Nyame et al., 2004). Here we evaluated the glycan profile of the 31-kDa glycoproteins antigen by

mass spectrometry and lectin array. The role of *N*- and *O*-glycan playing on the 31-kDa antigen antigenicity was also characterized.

In this work we have demonstrated that immunological recognition of 31-kDa by immunoglobulins from infected sera is totally attributed to the presence of carbohydrates structures since the glycan oxidation with *m*-periodate and/or removing glycan by *N*-glycosidase PNGase *F* treatment resulted in abrogation of the immunoglobulin recognition (Figure 2). Morassutti *et al.* (2012), have also demonstrated, through oxidation of the carbohydrate experiment, that glycan moieties are essential for immunological recognition. The treatment of 31-kDa component with *O*-glycosidases has not changed the immune recognition, suggesting that only *N*-glycans are important for immunogenicity of this antigen (Figure 2).

In general, *N*-glycans seems to be more immunogenic molecules than *O*-glycans in helminthes (Haslam *et al.*, 2003; Hokke *et al.*, 2007; Paschinger *et al.*, 2012; Talabnin *et al.*, 2013). Furthermore, immunodominant epitopes from nematode surface and excreted/secreted antigens are often *m*-periodate and/or peptide-*N*-glycosidase sensitive (Okano *et al.*, 2001; Hokke 2007; Talabnin *et al.*, 2013; Sotillo *et al.*, 2014). These glycans are major targets for the host immune system and may be the key to successful parasite defense strategies, as they play a vital role on immunomodulation, inducing *Th*-2 type responses (Dell *et al.*, 1999; Nyame *et al.*, 2002; Pearce *et al.*, 2004).

Even through, glycans from parasites are composed of very unique structures (Maizels & Selkirk, 1988), here the MALDI spectra of the released *N*-glycans of 31-kDa antigen (Table II) are dominated for glycans structures such Man5-GlcNAc and Man3-GlcNAc, which are structures often identified among glycans of parasites (Haslam *et al.*, 1996, 1998; Dell *et al.*, 1999). These results are surprising as the 31-kDa is considered a very specific antigen, and the *N*-glycans are fundamental for the immune recognition. Further analysis, maybe using alternative MS methods, will provide more detailed data about this antigen.

The presence of *O*-glycans in purified 31-kDa glycoproteins was screened by reductively elimination of the peptide mixture after PNGase *F* treatment. No signals corresponding to *O*-glycans were observed. This is consistent with our observations

in WB analysis, where the O-glycosidase treatment did not change the immune recognition of the 31-kDa antigen (Figure 2).

In a previous work, our group showed that *A. cantonensis* female worms present complex-type, high mannose and truncated-type *N*-glycans, and these structures could be terminated with Gal and GlcNAc, however the glycan structure of the 31-kDa antigen contains just terminal with mannose. The computational modeling of the NAC, 14-3-3, and Epsom coatamer subunit (Figure 1), glycoproteins previously identified in the 31-kDa antigen (Morassutti et al., 2012), shown us the possible sites of glycosilation and glycan structures that each glycoprotein contains. The analysis reveled sites for N-glycosilation that could contain small glycans with the same feactures, man3-5GlcNAc, identified by MS analysis.

In addition at least three lectins that showed positive binding in lectin array can recognize mannose, MNA-M and VFA with moderate affinity. However, even throug this result support the MS results presented in this study, it is necessary other analysis to confirm or not the presence of other structures, as Gal $\beta$ <sub>1-4</sub>GlcNAc (Terminal), Gal $\alpha$ , GalNAc $\alpha$  (terminal), as it were the main structures that lectin recognizing in 31-kDa antigen (Table II).

Fucose was not detected detected, either in the core of *N*-linked glycans or terminals of glycans identified from 31-kDa antigen of *A. cantonensis*. Two types of fucosylation of the proximal GlcNAc of *N*-linked core structures have being described, fuc $\alpha$ <sub>1-6</sub> and  $\alpha$ <sub>1-3</sub>, which is resistant to digestion by PNGase *F*. While further analysis of *N*-glycans released by PNGase *A* would eventually provide a more comprehensive *N*-glycan profile for this antigen, it is important to note that PNGase *F* digestion abrogated the immune recognition of 31-kDa antigen by infected human serum (Figure 2), indicating that the structural features which is essential for immunogenicity have Fuc $\alpha$ <sub>1-6</sub> core GlcNAc residue, which is commonly found in helminthes (Haslam et al., 1996, 1998; Houston and Harnett, 2004; Hokke et al., 2007).

Here we report the central role that *N*-linked glycans plaing in the immunogenicity of 31-kDa. It is the main antigen used for EM diagnosis caused by *A. cantonensis* and considering the fundamental role of glycans playing in the immune recognition of the antigen it is an important step for improviment of the diagnostic tests and may contribute to define a better expression system for the glycoproteins



present in the 31-kDa antigen. Also it is an important gain for new insights about the parasite biology.

## **Materials and Methods**

### *Worms and Antigen preparation*

Cycle of parasite has been maintained at Laboratório de Biologia Parasitária, PUCRS, Porto Alegre city, Brazil, since 2013. Where Wistar rats are used definitive hosts, and *Biomphalaria glabrata* as intermediate hosts. After 42 days of infection, the rats were sacrificed and the worms collected from their pulmonary veins and frozen at -20 °C.

Total soluble extract (TE) was obtained from female worms. About 40 worms were macerated in liquid nitrogen and homogenized extraction buffer (phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4), 0,01% triton X-100 and proteases inhibitors kit (Qiagen). The suspension was centrifuged at 12.000 x g for 1 h at 4 °C, and the supernatants were used to derive the TE. Protein concentrations were determined by the Qiubt assay (Invitrogen).

### *Obtaining 31-kDa Antigen*

One dimensional electrophoresis of 4-12% polyacrylamide Bis-Tris gels with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) were used to separate proteins of TE. The band of proteins at 31-kDa region was cut from the gel and eluted with 50mM TrisHCl, pH 7.5, 150 mM NaCl and 0.1mM EDTA, for 18 h. The eluted proteins were recovered from supernatant by centrifugation at 10.000 x g for 5 minutes. Proteins were then concentrated with Millipore filters (30k). This fraction was used for the further analysis.

### *Western Blot (WB) with glycosidases and Meta-periodate oxidation*

The proteins resolved by one dimensional electrophoresis of 4-12% polyacrylamide Bis-Tris gels were electro-transferred onto nitrocellulose membranes and blocked with 5% milk for 2 h at room temperature. The membranes were then incubated for 2 h with a pool of sera (1:200 dilution), prepared from three positive sera for cerebral angiostrongyliasis. After three washes, the membranes were probed

with a secondary peroxidase-conjugated anti-human IgG (diluted 1:5000; Abcam, Cambridge, UK) for 2 h at room temperature. Diaminobenzidine (DAB) (Sigma-Aldrich; 0.05% DAB and 0.015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS, pH 7.4) was added as developer reagent.

*N-Glycosidase F (PNGase F) treatment:* The PNGase *F* treatment followed the kit instructions (PNGase *F*, Recombinant 500.000 units/ mL – BioLabs, UK). PNGase *F* was added at final concentration 1.0 µL/µg of total proteins and the reaction was incubated at 37 °C for overnight. Control of reaction was done by adding 1,0 µL of PBS, instead of PNGase *F*. The reaction was mixed with Laemmli buffer for SDS-PAGE and WB as mentioned before. *O-Glycosidase treatment:* After electro-transference the nitrocellulose membrane was blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) for 2 h at room temperature. The membranes were washed and incubated with *O*-glycosidase (0,02 U; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for 18 h and proceeding with *O*-glycosidase (0,02 U; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for more 18 h at room temperature, or directly incubated with *O*-glycosidase without a pre-treatment with α-L-Fucosidase. After three washes, the WB were performed according to above.

*Sodium meta-periodate treatment:* Proteins were resolved by 1DE gel (1 µg/ line) and electro-transferred onto nitrocellulose membranes, washed three times with PBS-Tween 0,05%, incubated for 30 min with 100mM NaOAc, pH 5.0. After, membrane was incubated with a sodium *m*-periodate solution (20mM NaIO<sub>4</sub> diluted in 100mM NaOAc), and kept at 37 °C for 1 h, in dark. After washing with 100mM NaOAc, the membrane was incubated with 50mM NaBH<sub>4</sub> in PBS-Tween 0,05% for 30 min at room temperature. After western blot were performed according to above.

### *Lectin Array*

The glycoproteins in 31-kDa antigen were labeled with 10µM Bodipy-558 succinimidyl ester (Invitrogen, Mount Waverly, Victoria) in PBS, pH 7.4, and incubated for 45 minutes at room temperature and the excess dye was removed. A set of 86 lectin (supplementary material) were printed using an Arrayit SpotBot Extreme microarray printer (Lectins obtained from EY Laboratories, San Mateo, CA and Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and the lectin array analysis was preformed as

described previously (Hartley-Tassell *et al.*, 2010). BSA was used as a negative control. Fluorescent image acquisition and measurement were obtained by using the ProScanArray Microarray scanner (Perkin Elmer, Waltham, MA). Image analyzes were carried out with ProScanArray software, ScanArray Express (Perkin Elmer). The mean and standard deviation value were determined in triplicates. Samples with signal intensity/standard deviation (SD) > 3 and signal/noise ratio (the mean value of the raw signal/the mean value of BSA signal) > 1.5 were considered positive binding events. CVs were calculated to assess reproducibility.

### *Mass Spectrometry*

*Two-dimensional electrophoresis (2DE):* The 2DE gel was used to obtain the 31-kDa spots separated. 200µg of total protein from TE was precipitated over night with cold 100% acetone, followed by resolubilization in Rehydration Solution (GE Healthcare) contained 0.5% carrier ampholytes (v/v), and reduction and alkylation with 5 mM Tributylphosphine and 20 mM Acrylamide. The samples were in-gel rehydrated on 11-cm pH 4–7 Linear IPG strips (GE Healthcare) for 10 hours, and isoelectric focusing was performed using Isoelectric Focusing System (GE Healthcare). After isoelectric focusing, the strips were soaked for 20 min in equilibration buffer (20% v/v glycerol, 6M urea, and 2% SDS). The second dimension was done using on 6–20% polyacrylamide Bis-Tris gels with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDSPAGE; Bio-Rad, Hercules, CA). Proteins resolved in gel were then electro-transferred onto PVDF membranes (Millipore). After the transference the membranes were stained with direct blue and the 31-kDa spots were carefully cut off of the membrane.

The MS analyses followed the protocol described previously (Jensen *et al.* 2012). Briefly, *N*-glycans are enzymatically released from PVDF membranes by digestion with 5 U *N*-glycosidase F (PNGase F, *Flavobacterium meningosepticum*, Roche) in 10 µL water, for 18 h at 37°C. After separation, the *N*-glycans were reduced by 0,5M NaBH<sub>4</sub> in 50 mM KOH for 3 h at 50°C, desalted using micro-columns (cation exchange resin AG50W-X8 and Porous Graphitic Carbon in solid-phase extraction) and then analyzed by liquid chromatography-electrospray

ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). After *N*-glycans digestion, *O*-glycans were chemically released from the same spot by reductive  $\beta$ -elimination, desalted and analyzed by LC-ESI-MS/MS.

#### *Computational analyse of the proteins present in the 31-kDa antigen*

The computational analyse of the available peptide sequences of the NAC, 14-3-3 protein, and epsilon coatamer subunit proteins were done using ExPASy and the modeling using Maestro (Schrodinger) software.

#### *Ethical considerations*

This study had prior approval by the Ethics Committee in Animal Studies at the Pontificia Universidade Católica - PUCRS (CEUA – PUCRS), N°3/00331.

#### **Acknowledgments**

To the Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, Brazil. The authors gratefully acknowledge the Institute for Glycomics, Griffith University - Lectin Array Facility.

#### **References**

- Ali AB, Van den Enden E, Van Gompel A, Van Esbroeck M. 2008. Eosinophilic meningitis due to *Angiostrongylus cantonensis* in a Belgian traveler. *Travel Med Infect Dis* 6(1–2): 41–44.
- Cummings RD, Nyame AK. 1999. Schistosome glycoconjugates. *Biochim Biophys Acta*, 1455: 363–74.
- Dell A, Haslam SM, Morris HR, Khoo KH. 1999. Immunogenic glycoconjugates implicated in parasitic nematode diseases. *Biochim Biophys Acta*. 1455(2-3):353-62.
- Eamsobhana P. 2006. The rat lungworm *Parastrongylus* (= *Angiostrongylus*) *cantonensis*: parasitology, immunology, eosinophilic meningitis, epidemiology and laboratory diagnosis. Bangkok, Wankaew (IQ) Book Center Co Ltd. 45

- Eamsobhana P, Yong HS. 2009. Immunological diagnosis of human angiostrongyliasis due to *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae). *Int J of Inf Dis* 13:425-431
- Graeff-Teixeira C, Avila-Pires FD, Machado RCC, Camillo-Coura L, Lenzi HL. 1990. Identificação de roedores silvestres como hospedeiros do *Angiostrongylus costaricensis* no Sul do Brasil. *Rev Inst Med Trop* 32: 147-150.
- Graeff-Teixeira C, da Silva AC, Yoshimura K. 2009. Update on eosinophilic meningoencephalitis and its clinical relevance. *Clin Microbiol Rev* 22(2):322-48.
- Hartley-Tassell LE, Shewell LK, Day CJ, Wilson JC, Sandhu R, Ketley JM, Korolik V. 2010. Identification and characterization of the aspartate chemosensory receptor of *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol* 75:710–730.
- Haslam SM, Coles GC, Munn EA, Smith TS, Smith HF, Morris HR, Dell A. 1996. *Haemonchus contortus* glycoproteins contain N-linked oligosaccharides with novel highly fucosylated core structures. *J Biol Chem* 271:30561– 30570.
- Haslam SM, Coles GC, Reason AJ, Morris HR, Dell A. 1998. The novel core fucosylation of *Haemonchus contortus* N-glycans is stage specific. *Mol Biochem Parasitol* 93(1):143-7.
- Haslam SM, Restrepo BI, Óbregón-Henao A, Teale JM, Morris HR, Dell A. 2003. Structural characterization of the N-linked glycans from *Taenia solium* metacestodes. *Mol & Bioch Paras* 126:103-7.
- Hokke CH, Deelder AM. 2001. Schistosome glycoconjugates in host-parasite interplay. *Glycoconj J* 18(8):573-87.
- Hokke CH, Deelder AM, Hoffmann KF, Wuhrer M. 2007. Glycomics-driven discoveries in schistosome research. *Exp Parasitol* 117:275–83.
- Houston KM, Harnett W. 2004. Structure and synthesis of nematode phosphorylcholine-containing glycoconjugates. *Parasitol* 129(Pt 6):655-61.
- Jensen PH, Karlsson NG, Kolarich D, Packer NH. 2012. Structural analysis of N- and O-glycans released from glycoproteins. *Nat Protoc* 7 (7):1299-310.
- Jitpimolmard S, Sawanyawisuth K, Morakote N, Vejjajiva A, Puntumetakul M, Sanchaisuriya K, Tassaneeyakul W, Korwanich N. 2007. Albendazole therapy for eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasitol Res* 100(6):1293–1296

- Maldonado Jr A, Simões RO, Oliveira AP, Motta EM, Fernandez MA, Pereira ZM, Monteiro SS, Torres EJ, Thiengo SC. 2010. First report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) in *Achatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) from Southeast and South Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 938–941.
- Maizels RM, Selkirk ME. 1988. Immunobiology of nematode antigens, in: P.T. Englund, F.A. Sher (Eds.), *The Biology of Parasitism*, Alan R. Liss, New York, pp. 285-308
- Morassutti AL, Levert K, Perelygin A, da Silva AJ, Wilkins P, Graeff-Teixeira C. 2012. The 31-kDa antigen of *Angiostrongylus cantonensis* comprises distinct antigenic glycoproteins. *Vector-Borne Zoonot Dis* 12(11):961-968.
- Morassutti AL, Perelygin A, Levert K, Lin SC, Lee YM, da Silva AJ, Wilkins PP, Graeff-Teixeira C. 2013. Expression of recombinant antigenic proteins from *Angiostrongylus cantonensis*: a brief report. *Hawaii J Med Public Health* 72(6 Suppl 2):58-62.
- Morassutti AL Thiengo SC, Fernandez M, Sawanyawisuth K, Graeff-Teixeira C. 2014. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: an emergent disease in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109(4): 399-407.
- Nuamtanong S. 1996. The evaluation of the 29 and 31 kDa antigens in female *Angiostrongylus cantonensis* for serodiagnosis of human angiostrongyliasis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 27:291–296.
- Nyame AK, Yoshino TP, Cummings RD. 2002. Differential expression of Lac-DiNAc, fucosylated LacDiNAc, and Lewis X glycan antigens in intramolluscan stages of *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* 88:890–897.
- Nyame AK, Kwar ZS, Cummings RD. 2004. Antigenic glycans in parasitic infections: implications for vaccines and diagnostic. *Arch. Biochem. Biophys* 426:182-200.
- Okano M, Satoskar AR, Nishizaki K, Harn Jr DA. 2001. Lacto-Nfucopentaose III found on *Schistosoma mansoni* egg antigens functions as adjuvant for proteins by inducing Th2-type response. *J Immunol* 167:442–50
- Patterson RM, Selkirk JK, Merrick BA. 1995. Baculovirus and insect cell gene expression: review of baculovirus biotechnology. *Environ Health Perspect* 103(7–8):756–9.

- Paschinger K, Gonzalez-Sapienza GG, Wilson IB. 2012. Mass spectrometric analysis of the immunodominant glycan epitope of *Echinococcus granulosus* antigen Ag5. *Int J Parasitol* 42(3):279-85.
- Pearce EJ, Colleen MK, Sun J, Taylor JJ, McKee AS, Cervi L. 2004. Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Immunol Rev* 201:117–26.
- Ramirez-Avila L, Slome S, Schuster FL, Gavali S, Schantz PM, Sejvar J, Glaser CA. 2009. Eosinophilic meningitis due to *Angiostrongylus* and *Gnathostoma* species. *Clin Infect Dis* 48: 322-327.
- Sawanyawisuth K, Takahashi K, Hoshuyama T, Senthong V, Limpawattana P, Intapan PM, Wilson D, Tiamkao S, Jitpimolmard S, Chotmongkol V. 2009. Clinical factors predictive of encephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *Am J Trop Med Hyg* 81: 698-701
- Sotillo J, Córtes A, Munoz-Antoli C, Fried B, Esteban JG, Toledo R. 2014. The effect of glycosylation of antigens on the antibody responses against *Echinostoma caproni* (Trematoda: Echinostomatidae). *Parasit* 141:1333-340.
- Talabnin K, Aoki K, Saichua P, Wongkham S, Kaewkes S, Boons GJ, Sriipa B, Tiemeyer M. 2013. Stage-specific expression and antigenicity of glycoprotein glycans isolated from the human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. *Int J Parasitol* 43(1):37-50.
- Wang QP, Lai DH, Zhu XQ, Chen XG, Lun ZR. 2008. Human Angiostrongyliasis. *Lancet Infect Dis* 8:621-630.
- Wisnewski N, McNeil M, Grieve RB, Wassom DL. 1993. Characterization of novel fucosyl- and tyvelosyl-containing glycoconjugates from *Trichinella spiralis* muscle stage larvae. *Mol Biochem Parasitol* 61:25–35.
- Wuhrer M, Koeleman CA, Deelder AM, Hokke CH. 2006. Repeats of LacDiNAc and fucosylated LacDiNAc on N-glycans of the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Febs J* 273:347–361.

**Apêndice B – Paper in preparation 2: Pathological and serological studies on mice and guinea pigs infected with *Angiostrongylus mackerrasae* as a model for human infection**

**Pathological and serological studies on mice and guinea pigs infected with *Angiostrongylus mackerrasae* as a model for human infection**

Mahdis Aghazadeh <sup>a,b</sup>, Helen Owen <sup>a</sup>, Marina Harvie <sup>b</sup>, Carolina De Marco Veríssimo <sup>c</sup>, Kieran Aland <sup>d</sup>, Simon Reid <sup>e</sup>, Don McManus <sup>b</sup>, Rebecca Traub <sup>f</sup>, James McCarthy <sup>b,e</sup>, and Malcolm K. Jones <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> School of Veterinary Science, University of Queensland, Gatton, Queensland 4343, Australia

<sup>b</sup> Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Queensland 4006, Australia

<sup>c</sup> Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>d</sup> Queensland Museum and Sciencentre, Queensland 4101, Australia

<sup>e</sup> School of Public Health, University of Queensland, Herston, QLD 4006, Australia

<sup>f</sup> Faculty of Veterinary and Agricultural Sciences, University of Melbourne, Parkville, Victoria 3052, Australia

**Abstract**

Two species of lungworm occurs in Australia. *A. cantonensis* that is known to cause eosinophilic meningitis in human and animals, and *A. mackerrasae* which is not well studied and it is not clear whether this species can infect human and other non-permissive hosts. This study investigates the pathogenicity of *A. mackerrasae* for the first time in non-permissive host including mice and guinea pigs. The mice brain lesions caused by *A. mackerrasae* were compared with lesions caused by the similar species *A. cantonensis* showing that both species cause similar pathogenicity in infected mice. The results of this study reveal that *A. mackerrasae* causes



eosinophilic meningitis in infected mice and guinea pigs and this suggests that the nematode can potentially cause meningitis in humans as well. This raises concerns about the unknown epidemiology of this species in Australia.

**Keywords:** *Angiostrongylus mackerrasae*, *Rattus fuscipes*, Rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, eosinophilic meningitis

## Introduction

*Angiostrongylus* taxa belong to Metastrongyloidea superfamily which includes a group of nematodes residing in circulatory system of their definitive hosts. *Angiostrongylus cantonensis* is the most widespread within the genus and to date is the only species of *Angiostrongylus* known to cause eosinophilic meningitis in human and other non-permissive hosts in several parts of the world (Cowie, 2013; Graeff-Teixeira et al., 2009; Morassutti et al., 2012; Wang et al., 2008). In more severe cases of infection, *A. cantonensis* is reported to cause eosinophilic granulomatous meningo-encephalomyelitis throughout the brain and spinal cord of accidental hosts (Collins et al., 1992; Mason et al., 1976; Wright et al., 1991) and fatal encephalitis in human (Sawanyawisuth et al., 2009). Although rare, pneumonia caused by presence of *A. cantonensis* adult worm has also been reported in human (Cui et al., 2011; Lindo et al., 2004).

Two species of *Angiostrongylus* occur in Australia; *A. cantonensis* which is found in introduced rat species *Rattus rattus* and *Rattus norvegicus* and *A. mackerrasae*, found mainly in native bush rats, *Rattus fuscipes* (Spratt, 2015). The two species are both neurotropic and have identical lifecycles in the definitive host (Bhaibulaya, 1974). Despite having an identical lifecycle to *A. cantonensis*, *A. mackerrasae* has been neglected as a potentially dangerous parasite in Australia. All case reports of neural angiostrongyliasis in Australia, fail to perform molecular identification of the parasite considering the chance that *A. mackerrasae* could be the cause of the disease and only confirm the species involved by morphology. However, morphological keys to distinguish the two species are limited (Aghazadeh et al., 2015; Bhaibulaya, 1968).

Even though *A. mackerrasae* has never been reported from humans, it has been recently recovered from the lung of a flying fox responsible for severe pneumonia (Mackie et al., 2013). Since *A. mackerrasae* has a similar lifecycle to *A. cantonensis* (Bhaibulaya, 1968) and it is genetically identical to the latter (Aghazadeh et al 2015, unpublished data), there is strong potential for *A. mackerrasae* to also be zoonotic and cause infection in humans, although much of its epidemiology remains unknown. This study investigates the potential pathogenicity of *A. mackerrasae* to human by infecting non-permissive hosts including mice and guinea pigs with this species and compared it with the infection caused by similar species *A. cantonensis*. The serological reaction of rats and guinea pigs infected with *A. mackerrasae* to human sera infected with *A. cantonensis* was also investigated. In addition, the alterations of spleen T cell subtypes were studied and compared between mice infected with the two *Angiostrongylus* species comparing to an uninfected control group.

## **Materials and Methods**

### ***Infection in mice and guinea pigs***

All work on this project was approved by the Animal Ethics Committee of the QIMR Berghofer Medical Research Institute under project P1457. The lifecycle of *A. mackerrasae* has been maintained in the lab using *Austropeplea lessoni* snails and Wistar rats. First stage larvae of *A. mackerrasae* were recovered from faeces of native rats, *Rattus fuscipes* which were trapped in south east Queensland under permit from the Department of Environment and Heritage Protection of the Queensland Government under permit WIS12109412. The rats were then euthanized and dissected to morphologically confirm the species of *Angiostrongylus* present in their lungs. First stage larvae recovered from faeces and lungs of *R. fuscipes* were used to infect snails. After 4 weeks, the infected snails were digested using artificial gastric juice to obtain infective third stage larvae (L3) of *A. mackerrasae*. The number of 24 outbred Swiss mice was divided into two groups and was infected by oral gavages with 30 third stage larvae of either *A. mackerrasae* or *A. cantonensis*. Also four Tri-colored Guinea pigs were infected with 35 larvae using vegetable

capsules directed to their esophagus by a cat pill popper. The animals were monitored daily post infection for changes in behavior. First group of four infected mice were euthanized on day 7 post infection and a second and a third group of four mice were culled on day 14 and 21 post infection, respectively. The infected guinea pigs were euthanized on day 16 post infection. Brain and spinal cord were removed from the carcasses and stored in 10% Formalin for 72 hours before histopathological sections being prepared from the tissues. The H&E stained paraffin sections were then examined using light microscopy.

### ***Studying T cell subtypes in splenocytes of infected mice***

Splenic lymphocytes of mice were collected and prepared as described by Anukmar and Shahir (2011). The cells were suspended in 4ml RPMI medium 1640 (1x) and stained using 0.4% trypan and counted under the microscope. Spleen lymphocytes were later incubated for an hour at 37°C with PMA (10ng/ml) and Ionomycin (1µg/ml) in 5% CO<sub>2</sub> flow. The cells were then incubated with BFA for 4 hrs and were later fixed using 4% formaldehyde at 4°C overnight as described by Liu et al. (2013). The mAbs labeled fluorescence were then added to the cells and the percentage of CD4<sup>+</sup> T, CD4<sup>+</sup> IL-4<sup>+</sup> T, CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> T and CD4<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T cells were calculated using flow cytometry for both day 14<sup>th</sup> and 21<sup>th</sup> post infection mice.

### ***Serological comparison***

#### *Antigen preparation*

Total soluble extract (TE) was obtained from harvested female worms that were macerated in liquid nitrogen and homogenized extraction buffer (phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4), 0.01% triton X-100 and proteases inhibitors kit (Qiagen)). The suspension was centrifuged at 12,000 x g for 1 h at 4 °C, and the supernatants were used to derive the TE. Protein concentrations were determined by Bradford assay according to the instructions of manufacturer. TE from male worms was produced as described above.

#### *SDS-Page and Western Blots (WB)*

One dimensional electrophoresis of 4-12% polyacrylamide Bis-Tris gels with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) were used to resolve proteins of TE and, then stained with Comassie blue.

For WB, resolved 100 ng, 1 ug or 3 ug of proteins were electro-transferred onto nitrocellulose membranes and after blocked with 5% powder milk for 2 h at room temperature. The membranes were then incubated for 2 h with different sera: (1) pool of human sera (1:200 dilution), prepared from either three patients diagnosed with cerebral angiostrongyliasis; (2) Rats sera (1:200 dilution); (3) GP sera (1:200 dilution). After three washes, the membranes were probed with a secondary peroxidase-conjugated anti-human IgG (1:5000; Abcam, Cambridge, UK), anti-Rats IgG (1:5000; Abcam, Cambridge, UK) or anti-GP igG (1:5000; Abcam, Cambridge, UK) for 2 hrs at room temperature. After three washes of PBS, Clarity Western ECL Blotting Substrate (Biorad) was added as a developer agent.

## Results

### ***A. mackerrasae infections in mice and guinea pigs***

Most of the infected animals showed variable degrees of pathological changes in the brain tissue. Hyperemia was observed on the surface of the brain tissue in all infected mice. The first group of mice, euthanized seven days post-infection, did not show any neurological signs and the reaction of their brain to the parasite was mild. Out of the four mice in this group, one showed perivascular cuffing and *Angiostrongylus* larvae were present in neuropil region of the brain in two of the mice (Figure 1, A&B). In one mouse, occasional small aggregates of less than 20 lymphocytes were present in meninges multifocally. Second group of four mice, euthanized 14 days post-infection, showed diffuse, moderate to marked, eosinophilic meningitis with Intralesional nematodes. Multifocal, mild eosinophilic encephalitis was also observed in two out of four mice culled two weeks post infection. In the group of mice euthanized 21 days post infection, diffuse marked eosinophilic and granulomatous meningitis coupled with intralesional nematodes were observed in all mice. Hemorrhagic meningitis was also observed in one mouse in this group.

In addition, all infected guinea pigs also showed various degrees of pathological changes in the brain sections. The larvae of *Angiostrongylus* were present in the meninges of all 4 animals. Within the cerebral, cerebellar, root meninges and the stroma of the choroid plexus, there were multifocal, moderate to dense populations of eosinophils, lymphocytes and macrophages in all four animals (Figure 2).

#### ***A.cantonensis* infection in mice**

The group of 12 mice infected with *A. cantonensis*, showed brain lesions to previously observed pathology (Reff

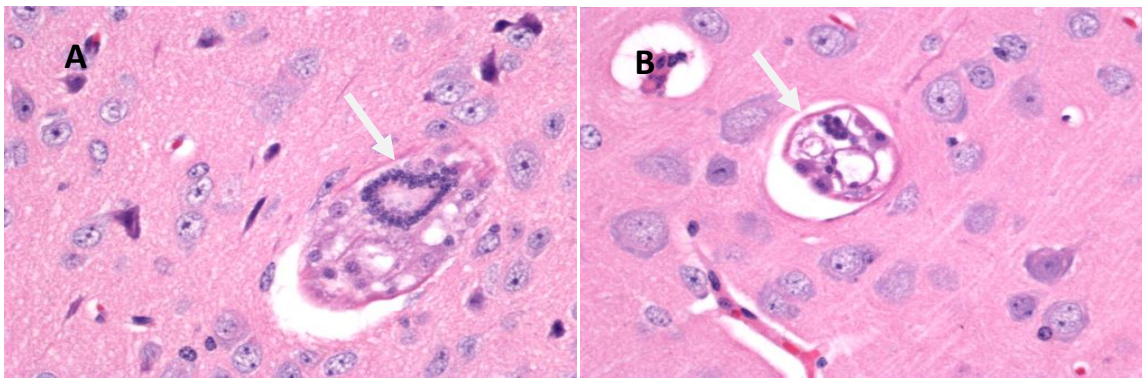


Figure 1: Larvae of *A. mackerrasae* in neuropil region of the mice brain, 7 days post infection (A and B).

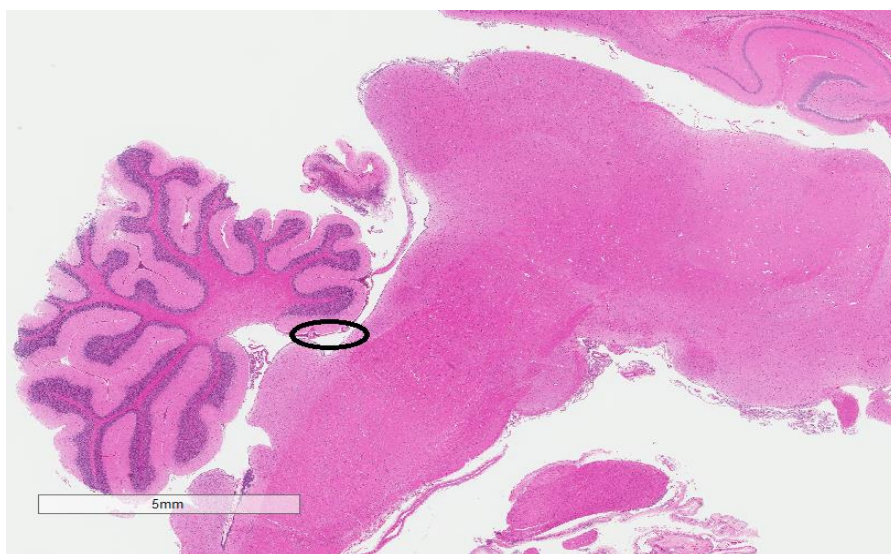


Figure 2: larvae of *A. mackerrasae* on the cerebral meninges (A) of the Guinea pig brain, 16 days post infection.

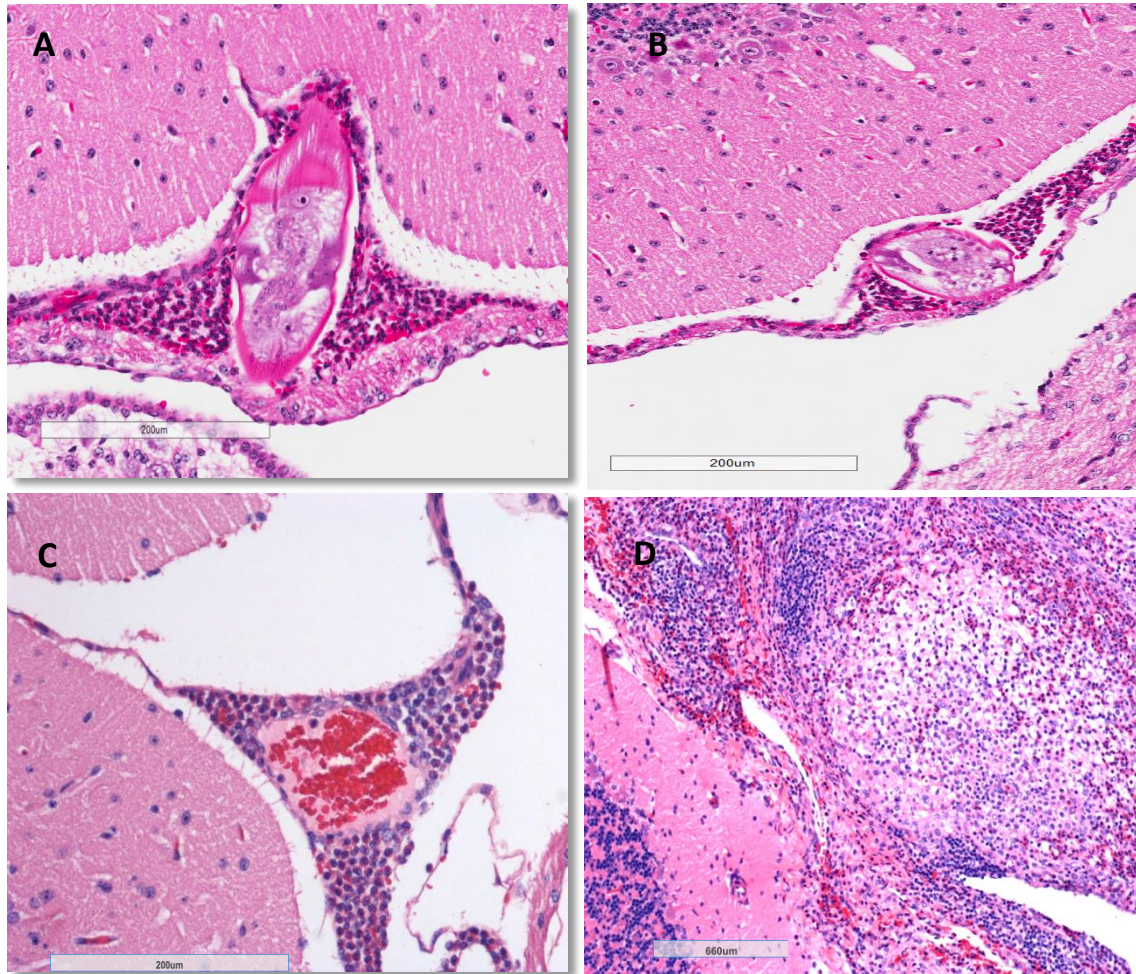


Figure 3: Pathological changes in the brain of infected guinea pigs with *Angiostrongylus mackerrasae*. A&B: Larvae of *A. mackerrasae* in cerebral meninges. C: Eosinophilic meningitis. D: Eosinophilic granuloma.

### ***Comparing pathogenicity between the two Angiostrongylus species***

The comparison between the two groups of mice infected with *A. cantonensis* and *A. mackerrasae* showed that the two species cause very similar pathology in infected mice (Figure 4).

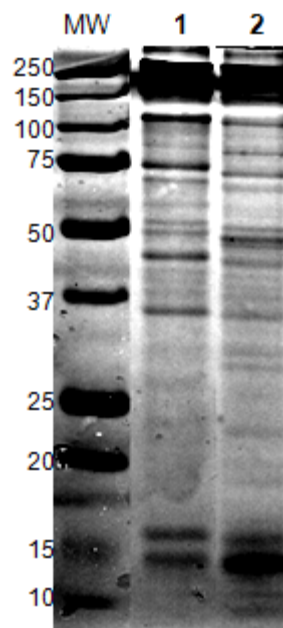
#### *Studying T cell subtypes in splenocytes of infected mice*

Splenic lymphocytes of mice were collected and prepared as described by Anukmar and Shahir (2011). The cells were suspended in 4ml RPMI medium 1640 (1x) and stained using 0.4% trypan and counted under the microscope. Spleen lymphocytes

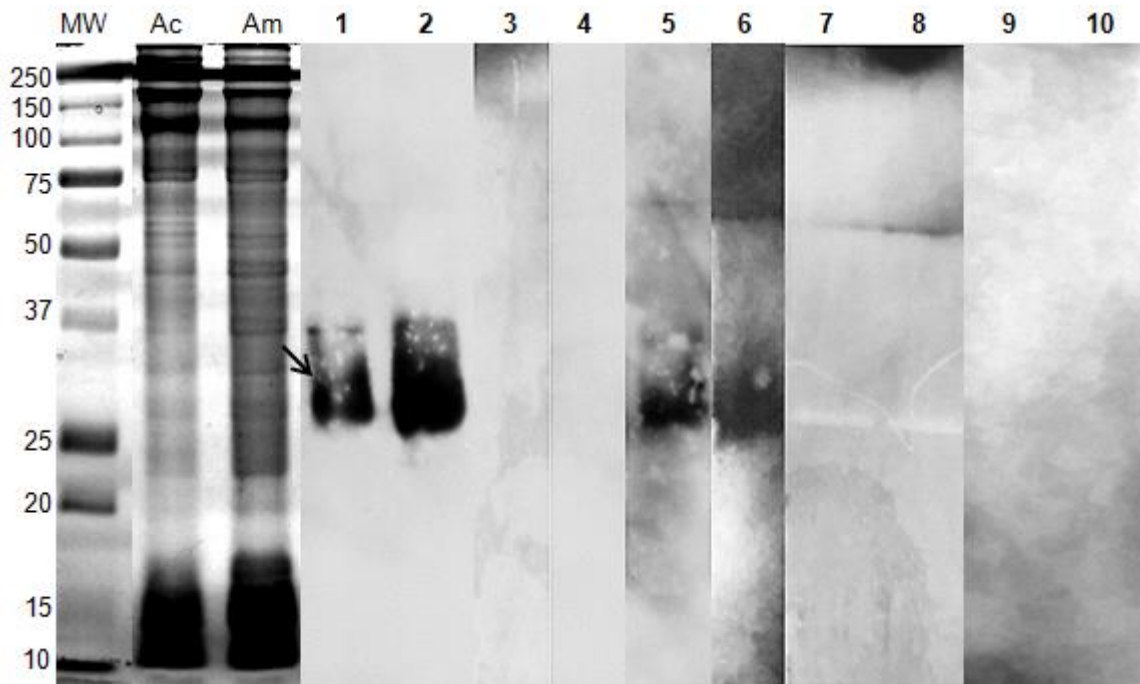
were later incubated for an hour at 37°C with PMA (10ng/ml) and Ionomycin (1µg/ml) in 5% CO<sub>2</sub> flow. The cells were then incubated with BFA for 4 hrs and were later fixed using 4% formaldehyde at 4°C overnight as described by Liu et al. (2013). The mAbs labeled fluorescence were then added to the cells and the percentage of CD4<sup>+</sup> T, CD4<sup>+</sup> IL-4<sup>+</sup> T, CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> T and CD4<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T cells were calculated using flow cytometry for both day 14<sup>th</sup> and 21<sup>th</sup> post infection mice.

### **SDS-Page and Western blots**

The protein extracts from female *A. mackerrasae*, Australian female *A. cantonensis*, male *A. mackerrasae* and Brazilian female *A. cantonensis* all showed different degrees of recognition to the serum from human infected with *A. cantonensis* from Brazil (positive control), serum from experimentally infected rat and guinea pigs with *A. mackerrasae*.



**Fig. 1** SDS-PAGE of *A. mackerrasae* worms soluble total extract (TE). 1: *A. mackerrasae* female; 2: *A. mackerrasae* Male. MW: Molecular weight (kDa).



**Fig 2.** Identification of 31-kDa antigen produced by *A. mackerrasae*. Female worm soluble total extract (TE) from Australian *A. cantonensis* (Ac) and *A. mackerrasae* (Am) were resolved in 1DE gel and transferred on Western Blot membranes. Lane 1: Ac-ET and Lane 2: Am-ET, probed with pool of positive controls for cerebral angiostrongyliasis (from Brazil); Lane 3: Ac-ET and Lane 4: Am-ET, probed with pool of normal human sera. Lane 5: Ac-ET and Lane 6: Am-ET, negative control for PNGase *F* treatment, probed with pool of positive controls for cerebral angiostrongyliasis (from Brazil); Lane 7: Ac-ET and Lane 8: Am-ET pretreated with PNGase *F* and probed with pool of positive controls for cerebral angiostrongyliasis; Lane 7: Ac-ET and Lane 8: Am-ET pretreated with PNGase *F* and probed with pool of normal human sera. The arrow indicates the 31-kDa band.

### **Flow cytometry**

The percentage spleen T cells from the control group and infection groups were different between *A. cantonensis* and *A. mackerrasae* infected mice. The percentage of CD4 T cells in splenocytes of infected mice was significantly higher in...

### **Discussion**



This research demonstrates for the first time that *A. mackerrasae* can cause severe meningitis in infected mice and guinea pigs and therefore it can potentially be pathogenic to human and dogs as well as other animals. The pathogenicity observed in this study caused by *A. mackerrasae* was consistent with previous work on guinea pigs (Perez et al., 1989) and mice (Sugaya and Yoshimura, 1988) infected with *A. cantonensis*. This result was expected as molecular comparison of *A. mackerrasae* with *A. cantonensis* showed that the two species share highly similar genetic makeup (Aghazadeh et al, 2015; unpublished data).

This study also reveals that both *A. cantonensis* and *A. mackerrasae* can be recognized by positive sera of cerebral angiostrongyliasis patients. The 31-kDa band described before from *A. cantonensis* was observed from *A. mackerrasae*, with the same sensibility, indicating that the two species express a set of very similar proteins. Previously, Ben et al. (2010) demonstrated the successful use of heterologous antigens in immune diagnosis of angiostrongyliasis (*A. cantonensis* and *A. costaricensis*), and Morassutti et al. (2012) corroborated these data showing that the 31-kDa antigen from *A. cantonensis* ET is recognized both by sera from patients with eosinophilic meningitis and abdominal angiostrongyliasis, indicating that both species of parasites produce very similar antigens. Here we found that another species of *Angiostrongylus* spp., *A. mackerrasae* can also be recognized by sera from human cases of eosinophilic meningitis caused by *A. cantonensis*. The cross reactivity observed between *A. cantonensis* and *A. mackerrasae* was expected but also indicates the necessity for further studies on the biology of *A. mackerrasae*, in order to determine possibility of human infection with any of the two or even in mixed infections.

The comparison of CD4 T cells between the infected and non-infected mice showed consistent results with those previously observed (Aoki et al., 1998; Liu et al., 2013).

### **Acknowledgements**

Mahdis Aghazadeh is supported by a University of Queensland Postgraduate Award. This research was supported by grants from the ANZ Queensland Community Foundation – Peter and Mary Ellen Stone Memorial Fund, awarded to Malcolm

Jones. The authors would like to thank Dr Rogan Lee from University of Sydney and Dr John Stanisic from Queensland Museum and Mr David McNeilly from QIMR Berghofer Medical Research Institute for their help and support during this study.

## References

- Aghazadeh, M., Jones, M.K., Aland, K.V., Reid, S.A., Traub, R.J., McCarthy, J.S., Lee, R., 2015. Emergence of neural angiostrongyliasis in eastern australia. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)* 15, 184-190.
- Anukumar, B., Shahir, P., 2011. Immune regulation in Chandipura virus infection: characterization of CD4+ T regulatory cells from infected mice. *Virology Journal* 8, 259.
- Aoki, M., Sugaya, H., Ishida, K., Yoshimura, K., 1998. The role of CD4+ and CD8+ T-cells in host morbidity and innate resistance to *angiostrongylus cantonensis* in the mouse. *Parasitol Res* 84, 91-99.
- Ben, R., Rodrigues, R., Agostini, A.A., Graeff-Teixeira, C., 2010. Use of heterologous antigens for the immunodiagnosis of abdominal angiostrongyliasis by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 105, 914-917.
- Bhaibulaya, M., 1968. A new species of *Angiostrongylus* in an Australian rat *Rattus fuscipes*. *Parasitology* 58, 789-799.
- Bhaibulaya, M., 1974. Experimental hybridization of *Angiostrongylus mackerrasae*, Bhaibulaya, 1968 and *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935). *International journal for parasitology* 4, 567-573.
- Collins, G.H., Rothwell, T.L., Malik, R., Church, D.B., Dowden, M.K., 1992. Angiostrongylosis in dogs in Sydney. *Australian veterinary journal* 69, 170-171.
- Cowie, R.H., 2013. Biology, systematics, life cycle, and distribution of *Angiostrongylus cantonensis*, the cause of rat lungworm disease. *Hawaii J Med Public Health* 72, 6-9.
- Cui, Y., Shen, M., Meng, S., 2011. Lung CT findings of angiostrongyliasis *cantonensis* caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *Clin Imaging* 35, 180-183.
- Graeff-Teixeira, C., da Silva, A.C., Yoshimura, K., 2009. Update on eosinophilic meningoencephalitis and its clinical relevance. *Clin Microbiol Rev* 22, 322-348, Table of Contents.

- Lindo, J.F., Escoffery, C.T., Reid, B., Codrington, G., Cunningham-Myrie, C., Eberhard, M.L., 2004. Fatal autochthonous eosinophilic meningitis in a Jamaican child caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 70, 425-428.
- Liu, H., Luo, X., Shen, E., Li, H., Ding, X., Chen, D., 2013. Alteration of T cell subtypes in spleen and antibodies of serum in mice infected with *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasitol Res.*
- Mackie, J., Lacasse, C., Spratt, D., 2013. Patent *Angiostrongylus mackerrasae* infection in a black flying fox (*Pteropus alecto*). *Australian veterinary journal* 91, 366-367.
- Mason, K.V., Prescott, C.W., Kelly, W.R., Waddell, A.H., 1976. Letter: granulomatous encephalomyelitis of puppies due to *Angiostrongylus cantonensis*. *Australian veterinary journal* 52, 295.
- Morassutti, A.L., Levert, K., Perelygin, A., da Silva, A.J., Wilkins, P., Graeff-Teixeira, C., 2012. The 31-kDa Antigen of *Angiostrongylus cantonensis* Comprises Distinct Antigenic Glycoproteins. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 12, 961-968.
- Perez, O., Capron, M., Lastre, M., Venge, P., Khalife, J., Capron, A., 1989. *Angiostrongylus cantonensis*: Role of eosinophils in the neurotoxic syndrome (Gordon-like phenomenon). *Experimental Parasitology* 68, 403-413.
- Sawanyawisuth, K., Takahashi, K., Hoshuyama, T., Senthong, V., Limpawattana, P., Intapan, P.M., Wilson, D., Tiamkao, S., Jitpimolmard, S., Chotmongkol, V., 2009. Clinical factors predictive of encephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 81, 698-701.
- Spratt, D.M., 2015. Species of *Angiostrongylus* (Nematoda: Metastrongyloidea) in wildlife: A review. *International journal for parasitology. Parasites and wildlife* 4, 178-189.
- Sugaya, H., Yoshimura, K., 1988. T-cell-dependent eosinophilia in the cerebrospinal fluid of the mouse infected with *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasite immunology* 10, 127-138.
- Wang, Q.P., Lai, D.H., Zhu, X.Q., Chen, X.G., Lun, Z.R., 2008. Human angiostrongyliasis. *Lancet Infect Dis* 8, 621-630.
- Wright, J.D., Kelly, W.R., Waddell, A.H., Hamilton, J., 1991. Equine neural angiostrongylosis. *Australian veterinary journal* 68, 58-60.

**Apêndice C – Paper in preparation 3: *In silico* and biological analysis of glicidic profile and potential glycan biosynthesis pathways of *Angiostrongylus cantonensis***

**Paper in preparation 3: *In silico* and biological analysis of glicidic profile and potential glycan biosynthesis pathways of *Angiostrongylus cantonensis***

Authors: Carolina De Marco Veríssimo; Leandro de Mattos Pereira; Alessandra Loureiro Morassutti; Carlos Graeff-Teixeira

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

**Abstract**

**Key Words**

**1. Introduction**

2. Material and Methods

**2.1. Lectina array analysis of the *A. cantonensis* soluble total extract (TE) and excretory-secretory extract (SE)**

The glycoproteins in male and female TE and ES antigens were labeled with 10 $\mu$ M Bodipy-558 succinimidyl ester (Invitrogen, Mount Waverly, Victoria) in PBS, pH 7.4, and incubated for 45 minutes at room temperature and the excess dye was removed. A set of 86 lectin (supplementary material) were printed using an Arrayit SpotBot Extreme microarray printer (Lectins obtained from EY Laboratories, San Mateo, CA and Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and the lectin array analysis was performed as described previously (Hartley-Tassell *et al.*, 2010). BSA was used as a negative control. Fluorescent image acquisition and measurement were obtained by using the ProScanArray Microarray scanner (Perkin Elmer, Waltham, MA). Image analyzes were carried out with ProScanArray software, ScanArray Express (Perkin Elmer). The mean and standard deviation value were determined in triplicates. Samples with signal intensity/standard deviation (SD) > 3 and signal/noise ratio (the

mean value of the raw signal/the mean value of BSA signal) > 1.5 were considered positive binding events. CVs were calculated to assess reproducibility.

## **2.2 *In silico* analysis of *A. cantonensis* genome and transcriptome – Searching for enzymes involved with N- and O-glycans biosynthesis**

The *A. cantonensis* transcriptome was obtained with Platform ILLUMINA HiSeq 2500, through MACROGEN company ([www.macrogen.com/](http://www.macrogen.com/)). The *A. cantonensis* cDNA fragments sequencing were done through the two ends (pair-end). The “reads” were processed using Trimmomatic tool (Bolger et al., 2014), following three steps: i) Adapters removing; ii) Reads removing, keeping the score of quality up to 20 (Phred scale); iii) Reads removing (fragments up to 50 nucleotides).

The Trinity program was used for transcriptome assembly (Grabherr et al., 2011), through the De Bruijn scheme. Transdecoder program (<https://transdecoder.github.io/>) was used for prediction and retention of coding regions, using ab-initio models as parameters, transcripts containing similarities against protein domains obtained with PFAM ([pfam.sanger.ac.uk/](http://pfam.sanger.ac.uk/)), and all protein sequences obtained with SWISS-prot ([www.uniprot.org/](http://www.uniprot.org/)).

The predict proteins from *Angiostrongylus* genome were obtained from WormBase (<https://www.wormbase.org/>). The mapping of metabolic pathways was obtained from KEGG database (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, Kanehisa & Goto, 2000), that contains all proteins predicted by computational analysis or verified through experiments for the respective enzymatic activity (Barrett., 1997). After, the predict proteins of the *A. cantonensis* genome and transcriptome were annotated using AnEnPi software (Otto et al., 2008), and the final results were presented using KEGG mapper tool ([http://www.genome.jp/kegg/tool/map\\_pathway2.html](http://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway2.html)).

## **2.3 Mass spectrometry of N- and O-glycans from *A. cantonensis* TE and SE**

*Parasite worms*

The cycle of *Angiostrongylus* has been maintained at Laboratório de Biologia Parasitária, PUCRS, Porto Alegre city, Brazil, in Wistar rats, as definitive hosts and *Biomphalaria glabrata* as intermediate hosts. Three rats were infected with L3 and euthanized 42 days post-infection, the adult worms were collected from pulmonary arteries and used to obtain excretory–secretory antigen (ES) or total soluble extract (TE).

#### *ES preparation*

*A. cantonensis* adult worms were cultivated *in vitro*. About 30 couples of worms carefully collected were washed two times with 1x PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4) and once in RPMI 1640 culture medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) to eliminate host cell contaminants and maintained in 20 mL RPMI supplemented with 100 µg/mL penicillin and 100 U/mL streptomycin at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. The medium was changed every 24 h for 3 days. The medium collected was centrifuged at 15,000 x g for 10 min and supernatants concentrated 20x and buffer exchanged with 1x PBS using Amicon Millipore filters (3 kDa MWCO). Protein concentrations were determined by the Qiubt kit assay (Invitrogen).

#### *Total soluble extract (ET) preparation*

A pool of female or a pool of male worms were macerated separately in liquid nitrogen, mixed in extraction buffer (PBS; pH 7.4), 0,01% triton X-100 and proteases inhibitors cocktail (Qiagen), and then centrifuged at 12.000 x g for 1 h at 4 °C. The supernatant with soluble molecules were collected, protein measured and kept frozen at -80°C until use.

### Mass Spectrometry (MS) analysis

Analyzes of MS followed the protocol described previously (Jensen *et al.* 2012). Briefly, about 15 µg of TE from male and/or female worms as well as ES samples were immobilized separately on PVDF membranes (Millipore). *N*-glycans were enzymatically released by digestion with 5 U *N*-glycosidase F (PNGase F, *Flavobacterium meningosepticum*, Roche) in 10 µL water, for 18 h at 37°C. After separation, released *N*-glycans on supernatant were reduced by 0,5M NaBH<sub>4</sub> in 50 mM KOH for 3 h at 50°C, desalted using micro-columns (cation exchange resin AG50W-X8 and Porous Graphitic Carbon in solid-phase extraction) and then analyzed by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). After *N*-glycans digestion, remaining glycans, *O*-glycans, were chemically released from the same spot by reductive β-elimination, desalted and analyzed by LC-ESI-MS/MS.

## 3. Results

### 3.1 Comparative Lectina array signature of the *A. cantonensis* female ET, male ET and ES extract.

**Table 1.** Comparative lectin binding signature of the *A. cantonensis* male TE, female TE, and ES extract.

Lectin	Affinity to	Binding intensity		
		Male TE	Female TE	ES
AAA	Fucα <sub>1-2</sub>	[Dark Grey]		
ABA	Galβ <sub>1-3</sub> GalNAc	-	-	[Light Grey]
ACA	Galβ <sub>1-3</sub> GalNAc	-	[Light Grey]	-
ASA	Manα <sub>1-3</sub>	[Dark Grey]	-	-
BDA	GalNAcα, GalNAcβ	[Light Grey]	[Dark Grey]	

BPA	GalNAc $\alpha$ , Gal $\alpha$	-		
BS-I	Gal $\alpha$ , GalNAc $\alpha$ (terminal)	-		
CA	Gal $\beta$ <sub>1-4</sub> GlcNAc, GalNAc $\beta$ <sub>1-4</sub> GlcNAc			
Calsepa	Man, Glc, Glc $\alpha$ <sub>1-4</sub> Glc		-	
CCA	GlcNAc $\beta$ <sub>1-2</sub> Man $\alpha$ <sub>1-3</sub> (GlcNAc $\beta$ <sub>1-2</sub> Man $\alpha$ <sub>1-6</sub> )Man $\beta$ <sub>1-4</sub> GlcNAc $\beta$ <sub>1-4</sub> GlcNAc $\beta$	-	-	
ConA	Man (Terminal, Branched), GlcNAc			
CPA	Man $\alpha$ ? Man?			-
CSA	GalNAc $\alpha$ (Terminal)	-		-
DBA	GalNAc $\alpha$ <sub>1-3</sub> GalNAc, GalNAc $\alpha$ <sub>1-3</sub> Gal			
ECA	Gal $\beta$ <sub>1-4</sub> GlcNAc (Terminal)	-		
EEA	GalNAc $\beta$	-		-
GNA	Man $\alpha$ (Terminal)			-
GS-I-B4	Gal $\alpha$ (Terminal)			-
GS-II	GlcNAc $\alpha$ , GlcNAc $\beta$	-	-	
HAA	GlcNAc $\alpha$ , GalNAc $\alpha$	-	-	
HHA	Man $\alpha$ (Terminal)		-	
HMA	GalNAc $\alpha$ , Fuca $\alpha$ , Neu5Ac		-	
HPA	GalNAc $\alpha$ (Terminal)			-
IAA	GalNAc		-	
LAA	GlcNAc $\beta$ , GlcNAc $\beta$ <sub>1-4</sub> GlcNAc		-	-
LcH	Man/GlcNAc core with Fuca $\alpha$ <sub>1-6</sub>			-
LcHB	$\alpha$ Man > $\alpha$ Glc, GlcNAc	-	-	
LFA	Neu5Ac			-
LPA	Neu5Ac	-		-
LBA	GalNAc $\alpha$ , GalNAc $\alpha$ <sub>1-3</sub> (Fuca $\alpha$ <sub>1-2</sub> )Gal	-		-
MAA	Neu5Ac $\alpha$ <sub>2-3</sub> Gal	-	-	
MNA-G	Gal $\alpha$ , Gal $\beta$	-		
MPA	Gal $\alpha$ , GalNAc $\alpha$		-	-
PEA	Man $\alpha$ , Glc $\alpha$ , GlcNAc $\alpha$			
PHA-E	Gal $\beta$ <sub>1-4</sub> GlcNAc $\beta$ <sub>1-2</sub> (Gal $\beta$ <sub>1-4</sub> GlcNAc $\beta$ <sub>1-6</sub> )Man	-	-	
PHA-L	Gal $\beta$ <sub>1-4</sub> GlcNAc $\beta$ <sub>1-2</sub> Man	-		-
PHA-M	N/A	-		-
PHA-P	N/A	-		-
PMA	Man $\alpha$ <sub>1-3</sub>	-	-	
PNA	Gal $\beta$ (Terminal)	-		
PSL	Neu5Ac $\alpha$ <sub>2-6</sub> Gal $\beta$ <sub>1-4</sub> GlcNAc,			
PTA Gal	Gal	-	-	
PTA GalNAc	GalNAc		-	-
RPA	N/A		-	-
RTA	Glc?		-	
SNA	Neu5Ac $\alpha$ <sub>2-6</sub> Gal, Neu5Ac $\alpha$ <sub>2-6</sub> GalNAc		-	
SNA-II	Gal $\beta$ and GalNAc $\beta$ (Terminals)		-	
SJL	Gal $\alpha$			-
SSA	GalNAc, Terminal, O-link			
STA	GlcNAc $\beta$		-	-
TKA	Gal $\beta$ , Gal $\beta$ <sub>1-4</sub> Glc (Lactose)			
VGA	Gal $\beta$ <sub>1-3</sub> GalNAc	-	-	

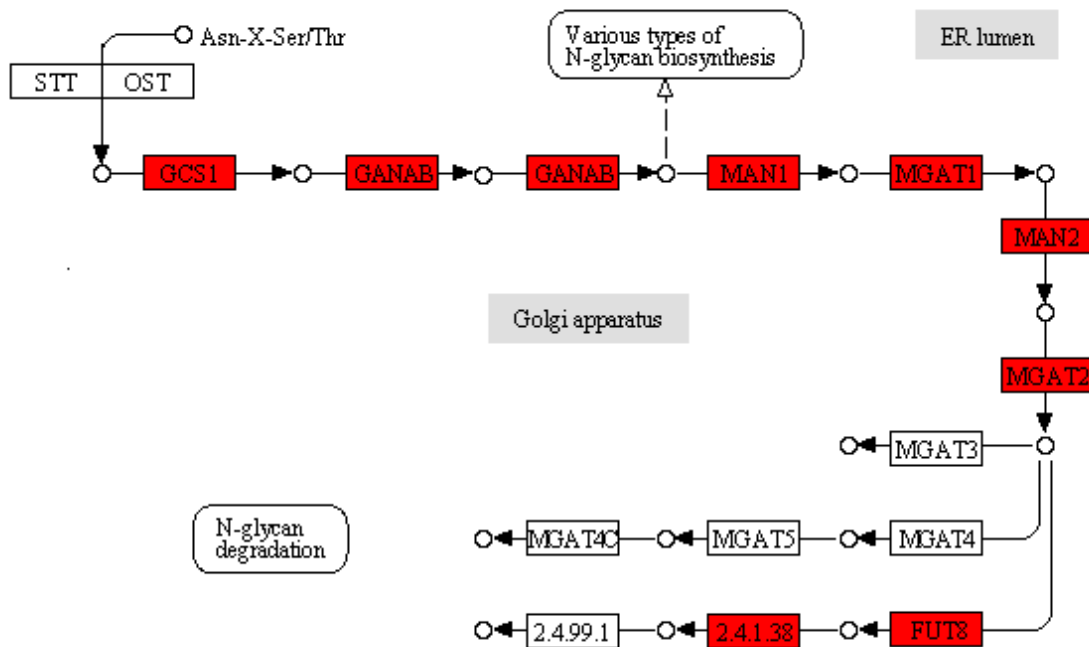


VFA	Man $\alpha$	Light grey	-	-
WFA	GalNAc $\alpha$ , GalNAc $\beta$	Dark	-	-
LecB (PA-IIL)	Fuc	Grey	-	-
LecA (PA-IL)	Gal	Light grey	-	-
RSL	Fuc	Light grey	-	Grey

Dark: High affinity; Grey: moderate affinity; Light grey: low affinity; White: no bind

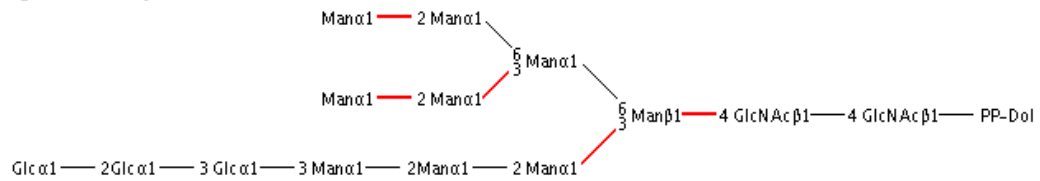
### 3.2 *In silico* identification of *A. cantonensis* enzymes involved with *N*- and *O*-glycans biosynthesis

This analysis showed that both genome and transcriptome of *A. cantonensis* have sequences encoding enzymes of the metabolic pathways involved with *N*- and *O*-glycans biosynthesis (Figure 1 - 4 and Table 2). Interesting, the enzymes that could be produced are involved in such glycosylation process that would allow the synthesis of glycan structures identified either by lectin array and MS analyses, as *N*-glycan core  $\alpha_{1-3}$  fucosylated and high mannose glycans (Figure e and table 3).

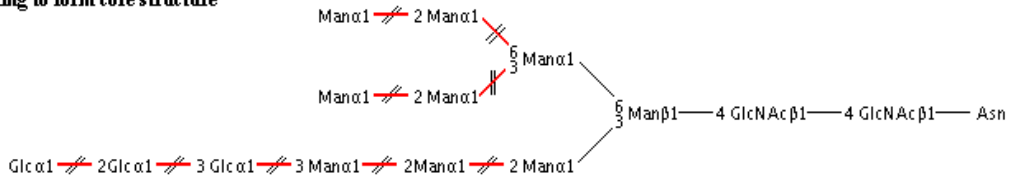


**Figure 1.** General *N*-glycans biosynthesis. In full square the enzymes identified in *A. cantonensis* genome

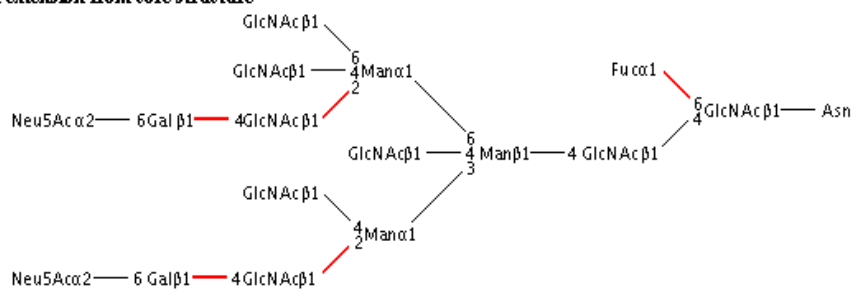
**N-glycan precursor biosynthesis**



**Trimming to form core structure**

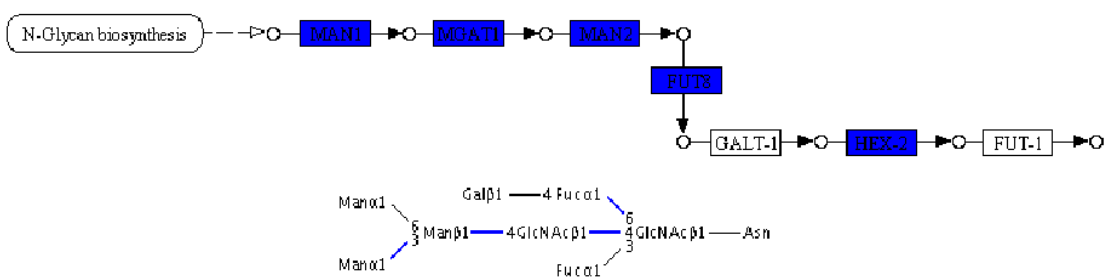


**Glycan extension from core structure**



**Figure 2.** Other *N*-glycan extensions. Red lines represent the enzymes identified in *A. cantonensis* genome

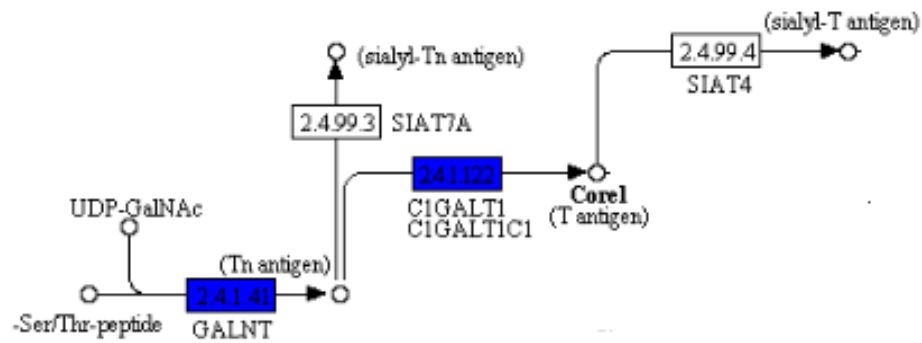
**Paucimannose type (Nematode)**



**Figure 3.** General *N*-glycans biosynthesis in nematode parasites. In full square the enzymes identified in *A. cantonensis* transcriptome.

**Table 2.** *In silico* analysis of enzymes involved in the glycan synthesis

EC	Gene	Enzyme	Genome	Transcriptome	Route involved
3.2.1.106	GCS1	Mannosyl-oligosaccharide glucosidase	X	X	
3.2.1.84	GANAB	Glucan 1,3-alpha-glucosidase	X	X	
3.2.1.113	MAN1	Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase.	X	X	
2.4.1.101	MGAT1	Alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein 2-beta-N-acetylglucosaminyltransferase	X	X	
3.2.1.114	MAN2	Mannosyl-oligosaccharide 1,3-1,6-alpha-mannosidase	X	X	
2.4.1.143	MGAT2	Alpha-1,6-mannosyl-glycoprotein 2-beta-N-acetylglucosaminyltransferase	X	X	<b>N-glycan biosynthesis</b>
2.4.1.145	MGAT4	Alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein 4-beta-N-acetylglucosaminyltransferase		X	
2.4.1.155	MGAT5	Alpha-1,6-mannosyl-glycoprotein 6-beta-N-acetylglucosaminyltransferase		X	
2.4.1.68	FUT8	Glycoprotein 6-alpha-L-fucosyltransferase	X	X	
2.4.1.38	-	Beta-N-acetylglucosaminylglycopeptide beta-1,4-galactosyltransferase	X	X	
3.2.1.52	HEX2	Beta-N-acetylhexosaminidase	X	X	<b>N-glycans biosynthesis is in nematode</b>
2.4.1.41	GALNT	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase	X	X	<b>O-glycan biosynthesis</b>
2.4.1.122	C1GALT1 / C1GALT1C1	Glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase	X	X	
2.4.1.221	OFUT1	Peptide-O-fucosyltransferase	X	X	<b>O-glycan Fucose type</b>



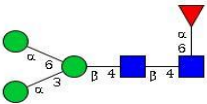
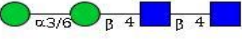
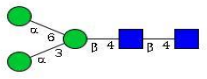
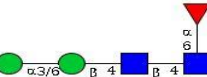
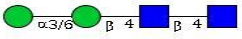
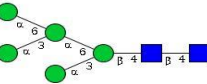
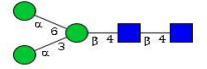
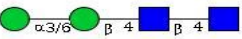
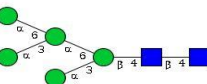
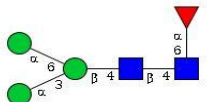
**Figure 4.** General O-glycans biosynthesis. In full square the enzymes identified in *A. cantonensis* transcriptome.

### 3.3 Identification of *N*- and *O*-glycan in *A. cantonensis* female TE, male TE and ES extract

Our MS analysis could identify a small number of *N*-glycans in each sample analysed (Table 3). *N*-glycan profile is different for *A. cantonensis* female and male worms. However, in this analysis, it was identified the same *N*-glycans profile for ES extract and TE form male worms. No signals consistent with *O*-glycans were identified in the analysis.

**Table 3.** *N*-glycan structures of Soluble total extract and Secretory-Excretory glycoproteins from *A. cantonensis* worms

Cartoon	m/Z	Type	Glycan
<b>ES</b>			
	911,4	Pauci	Man $\alpha$ 1-3(Man $\alpha$ 1-6)Man $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc
	1235,5	High Mannose	Man $\alpha$ 1-3(Man $\alpha$ 1-3Man $\alpha$ 1-6) Man $\alpha$ 1-6Man $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc

	1057,5	Pauci	Manα1-3(Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4(Fuca1-6)GlcNAc
	749,3	Pauci	Manα1-3/6Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc
<b>Female Worm</b>			
	911,4	Pauci	Manα1-3(Man α1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc
	895,4	Pauci	Manα1-3/6Manβ1-4GlcNAcβ1-4(Fuca1-6)GlcNAc
	749,3	Pauci	Manα1-3/6Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc
	1235,5	High mannose	Manα1-3(Man α1-3Man α1-6) Man α1-6Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc
<b>Male worm</b>			
	911,4	Pauci	Manα1-3(Man α1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc
	749,3	Pauci	Manα1-3/6Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc
	1235,5	High Mannose	Manα1-3(Man α1-3Man α1-6) Man α1-6Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc
	1057,5	Pauci	Manα1-3(Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4(Fuca1-6)GlcNAc

---

#### **4. Discussion and conclusion**

#### **5. References**

## ANEXOS

### Anexo A- Parecer do Comitê de Ética de Experimentação Animal – CEUA



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 035/13 – CEUA

Porto Alegre, 10 de junho de 2013.

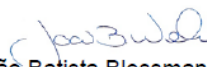
Senhor Pesquisador,

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 13/00331, “**Identificação e caracterização de glicídios para o diagnóstico das angiostrongilíases**”.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Lembramos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação.

Atenciosamente,

  
Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber  
Coordenador da CEUA/PUCRS

Ilmo. Sr.  
Prof. Dr. Carlos Graeff Teixeira  
FABIO  
Nesta Universidade

**PUCRS**

Campus Central  
Av. Ipiranga, 6681 – P. 99 – Portal Tecnopuc – sala 1512  
CEP: 90619-900 – Porto Alegre/RS  
Fone: (51) 3353-6365  
E-mail: [ceua@pucrs.br](mailto:ceua@pucrs.br)