UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Síntese e avaliação biológica de glicodicetopiperazinas relacionadas a mucinas de células tumorais e parasitárias

Maristela Braga Martins Teixeira

Ribeirão Preto
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Síntese e avaliação biológica de glicodicetopiperazinas relacionadas a mucinas de células tumorais e parasitárias

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientada: Maristela Braga Martins Teixeira

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Carvalho

Ribeirão Preto
2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Martins Teixeira, Maristela Braga
Síntese e avaliação biológica de glicodicetopiperazinas relacionadas a mucinas de células tumorais e parasitárias. Ribeirão Preto, 2010.
97 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.
Orientador: Carvalho, Ivone.

1. Mucina. 2. Glicoaminoácido.. 3. Dicetopiperazina. 4. *Trypanosoma cruzi*. 5. *Trans*-sialidase. 6. Antígeno Tn. 7. Citotoxicidade.

Maristela Braga Martins Teixeira

Síntese e avaliação biológica de glicodicetopiperazinas relacionadas a mucinas de células tumorais e parasitárias

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientada: Maristela Braga Martins Teixeira
Orientadora: Profa. Dra. Ivone Carvalho

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico

Aos meus pais Maria da Graça e José Martins,
pelo afeto, amparo e incentivo, e por demonstrarem que a dedicação
e a retidão são as maneiras mais nobres de alcançar o êxito;

Ao meu irmão Matheus,
pelo carinho, interesse e apoio, e por me motivar enquanto
procura entender os propósitos de minhas pesquisas;

Ao meu esposo Luís Gustavo,
pelo amor, companheirismo e atenção, e por ter participado de modo
paciente, mas não passivamente, ao longo deste Mestrado.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela Vida, pelas oportunidades e por Sua presença em todos os momentos, iluminando os passos desta caminhada;

À família, por sempre me oferecer estímulo e todas as condições para aceitar os desafios, e por ser esteio nas dificuldades;

À Profa. Dra. Ivone Carvalho, pela orientação que embasou minha formação científica, pelos conhecimentos compartilhados, pelo constante entusiasmo e estímulo e, sobretudo, pelo respeito e pela confiança.

À pós-doutoranda Vanessa Campo, pela fundamental e experiente contribuição desde o projeto deste trabalho, com idéias, auxílio experimental em numerosas reações e análises de RMN, e pela amizade decorrente desta parceria;

À aluna de iniciação científica Mônica Biondo, pela colaboração na preparação de doadores glicosídicos e nos trabalhos com os glicoaminoácidos de treonina;

Ao Prof. Robert Field, por ceder alguns blocos de glicoaminoácidos;

Ao doutorando Peterson de Andrade, pelos ensaios com a enzima *trans*-sialidade de *T. cruzi* e pela disponibilidade em discutir química de carboidratos;

Ao Prof. Dr. Sérgio Schenkman, por ceder a enzima *trans*-sialidade de *T. cruzi;*

Aos técnicos Luís Otávio Zamoner e Cláudia Macedo, pela ajuda com as atividades rotineiras do laboratório; Virgínia Betarello e Vinícius Palaretti pelas análises de RMN realizadas com agilidade; e José Carlos Tomaz, pelas análises de HRMS.

À mestranda Zumira Carneiro e à técnica Ana Cristina Polizello, pelos ensaios de citotoxicidade em células tumorais;

Aos Profs. Drs. Carlos Curti, Marcelo Baruffi e Auro Nomizo, por cederem as linhagens de cálulas tumorais B16F10 e Jurkat;

Aos Funcionários da Seção de Pós-Graduação Ana Lúcia Barbosa, Eleni Passos, Henrique Theodoro, Rosana Florêncio e Rossana Ribeiro, pela dedicação e solicitude no atendimento e nos serviços prestados;

Aos colegas do Laboratório de Química Farmacêutica: Vanessa, Lílian, Adriane, Peterson, Flávio, Michelle, Luís Otávio, Pedro, Daniel, Valquíria e Mônica pela agradável convivência e troca de experiências;

A Andréa Figueiredo Rinhel, Beatriz Girolineto, Daiane Torres, Ester Rossi, Geicimar Gonçalves, Helena Queiroz, Juliana Ladeira, Lariani Delboni, Margherita Fais, Marina Moriya e a todos os amigos que, próximos ou distantes, acompanharam este Mestrado, pela compreensão, colaboração e pelo essencial incentivo que me impulsionou para a conclusão do trabalho.

“É um espetáculo grandioso e belo ver o homem sair do seu próprio esforço, a bem dizer do nada; dissipar, por meio das luzes de sua razão, as trevas nas quais o envolveu a natureza; elevar-se acima de si mesmo; lançar-se, pelo espírito, às regiões celestes; percorrer com passos de gigante, como o sol, a vasta extensão do universo; e, o que é ainda maior e mais difícil, penetrar em si mesmo para estudar o homem e conhecer sua natureza, seus deveres e seu fim.”

Jean-Jacques Rousseau

“E não vai demorar que passemos adiante, no escopo e na perspectiva de uma grande e bela ciência, a se fazer arte em defesa da vida.”

Carlos Chagas

RESUMO

MARTINS TEIXEIRA, M. B. **Síntese e avaliação biológica glicodicetopiperazinas relacionadas a mucinas de células tumorais e parasitárias.** 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Mucinas são glicoproteínas altamente *O*-glicosiladas cuja principal característica estrutural é a presença de α-GalNAc ligado aos resíduos hidroxilados de serina e treonina. Em alterações celulares malignas, esse núcleo é exposto como um antígeno carboidrato associado a tumor (Tn) e sua alta expressão em células cancerosas faz dele um alvo para o desenvolvimento de abordagens contra o câncer. Mucinas de *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas, apresentam α-GlcNAc ligado à apoproteína, envolvido no processo de sialilação catalisado pela enzima fundamental *trans*-sialidase (TcTS) mediadora da invasão celular. Sendo o componente glicosídico do antígeno Tn um análogo estrutural e funcional de α-GlcNAc, pode influenciar na atividade de TcTS, alvo terapêutico para a Doença de Chagas. Neste contexto, foram sintetizados glicopeptídeos lineares e cíclicos derivados de GalNAc mimetizando sua ocorrência em mucinas tumorais e parasitárias. Doadores e aceptores glicosídicos convenientemente protegidos foram preparados e ligados entre si com α-estereosseletividade por dois métodos de glicosilação: perclorato/carbonato de prata (promotor clássico de referência) e brometo de mercúrio (promotor pela primeira vez utilizado para doadores glicosídicos do tipo azidocloreto). Os blocos de glicoaminoácidos obtidos foram acoplados a um segundo resíduo, formando glicodipeptídeos lineares inéditos, que originaram glicodicetopiperazinas funcionalizadas com α-GalNAc, igualmente inéditas a literatura, mediante a etapa de desproteção/ciclização. Glicoaminoácidos intermediários contendo α-GalNAc foram desprotegidos e submetidos a ensaios de cinética enzimática em TcTS, apresentando expressiva inibição de 57% a 79% da atividade da enzima. Os mesmos blocos foram avaliados quanto à citotoxicidade em células tumorais, apresentando entre 73% e 79% de morte celular na linhagem Jurkat e cerca de 30% na linhagem B16F10. Os resultados ensaios biológicos sugerem que os compostos de interesse preparados podem atuar como inibidores da enzima TcTS e agentes de citotoxicidade seletiva em células tumorais.

Palavras-chave: Mucina. Glicoaminoácido. Dicetopiperazina. *Trypanosoma cruzi. Trans*-sialidase. Antígeno Tn. Citotoxicidade.

ABSTRACT

MARTINS TEIXEIRA, M. B. **Synthesis and biological evaluation of glycodiketopiperazines related to mucins from tumoral and parasite cells.** 2010. 97 f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Mucins are heavily *O*-glycosylated glycoproteins which major feature being the presence of α-GalNAc bound to hydroxylated protein residues of serine and threonine. In malignant cell transformation this core is exposed as a tumor associated carbohydrate antigen (Tn), and its high-level expression in cancer cells turns it into a target for developing anticancer approaches. Mucins from *Trypanosoma cruzi*, aetiologic agent of Chagas Disease, display α-GlcNAc linking glycans to the apoprotein, involved in the sialilation process catalized by tran-sialidase enzyme (TcTS), essential cell invasion by the parasite. Being Tn antigen an structural and functional analogue of α-GlcNAc, it may interfere on TcTS, a therapeutic target Chagas Disease. In this context, linear and cyclic glycopeptides containing GalNAc were synthesized, mimicking their natural occurrence in tumoral and parasite mucins. Glycosidic donors and acceptors, conveniently protected were prepared and bound to each other with α-stereoselectivity, though two glycosylation methods: silver perchlorate/carbonate (classical reference promoter) and mercuric bromide (first used as a promoter for azidochloride donors). Glycoaminoacids building blocks obtained were coupled to a second residue, furnishing novel linear glycopeptides, which generated glicodiketopiperazines functionalized with α-GalNAc, equally unpublished, upon deprotection/cyclization step. Intermediate α-GalNAc-containing glycoaminoacids were deprotected and subjected to kinetic enzymatic assay on TcTS, showing expressive enzyme activity inhibition from 57% to 79%. The same compounds were assessed for cytotoxicity on tumoral cells, showing from 73% to 79% of death for Jurkat cells and about 30% for B16F10 cells. Biological results sugest that the prepared compounds of interest may act as TcTS enzyme inhibitors and selective cytotoxic agents on tumoral cells.

Keyword: Mucin. Glycoaminoacid. Diketopiperazine. *Trypanosoma cruzi. Trans*-sialidase. Tn Antigen. Cytotoxicity.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Oligossacarídeos, glicoconjugados e potencial terapêutico

Carboidratos compõem uma das três principais classes de biopolímeros, ao lado de proteínas e ácidos nucléicos. Até a poucas décadas, a importância biológica de sacarídeos estava limitada as suas funções energéticas e estruturais, as quais são extensivamente compreendidas e exploradas. Contudo, a constatação recente de que glicoconjugados desempenham papel essencial como moléculas de comunicação em diversos processos celulares desencadeou crescente interesse pelas propriedades de reconhecimento envolvendo carboidratos.[1,2]

Eventos fisiológicos e patológicos mediados por carboidratos estão relacionados a sinalização e diferenciação celular, crescimento tecidual, adesão e metástase, infecção por vírus, bactérias e protozoários, e resposta imune. Tal diversidade de atividades sugere a utilização de carboidratos para direcionar novas estratégias terapêuticas.[1,3] Alguns fármacos derivados de carboidratos, tanto naturais como análogos sintéticos, já foram introduzidos com sucesso no mercado, como é o caso do antiviral fosfato de oseltamivir (Tamiflu, Roche®), do antidiabético acarbose (Glucobay, Bayer®), do antitrombótico heparina e dos antibióticos aminoglicosídeos.[4]

No entanto, os papéis biológicos mais relevantes de carboidratos são desempenhados sob a forma de glicoconjugados, estruturas nas quais as glicanas encontram-se acopladas a biomoléculas de outras naturezas, principalmente glicoproteínas, glicolipídeos e âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI).[2,4] As aplicações clínicas de neoglicoconjugados ainda são incipientes, embora existam diversos avanços experimentais para abordagens diagnósticas, preventivas e curativas, tanto na criação de agentes terapêuticos inovadores, quanto no aprimoramento das propriedades de fármacos convencionais. Métodos em desenvolvimento incluem glicosilação de vetores virais sítio-dirigidos em terapia gênica, proteção das extremidades de hormônios peptídicos com carboidratos para prolongamento da meia-vida plasmática, *microarrays* de glicanas características de patógenos para detecção de anticorpos específicos, e acoplamento de antígenos sacarídicos a proteínas carreadoras para aplicação como imunógenos em vacinas sintéticas.[1]

O estudo dos aspectos estruturais e funcionais de glicoconjugados, também denominado glicômica, encontra-se em defasagem em comparação aos avanços já obtidos com genômica e proteômica. A maior limitação está relacionada à grande diversidade de estruturas compreendidas na classe de glicoconjugados, cuja microheterogeneidade deriva da ausência de controle genético direto sobre sua biossíntese e implica em grande

dificuldade de isolamento a partir de fontes naturais e sequenciamento. A obtenção sintética de oligossacarídeos e glicoconjugados tem sido beneficiada por melhoramento de protocolos em solução, novas metodologias automatizadas em fase sólida e procedimentos enzimáticos, permitindo o acesso a compostos puros em quantidades razoáveis para estudo dos processos biológicos mediados por carboidratos.[2,4]

As propriedades únicas dos monossacarídeos conferem alto grau de complexidade às cadeias oligossacarídicas. A constituição de cada monômero varia em número de carbonos, estereoquímica de cada centro quiral, tamanho de anel, tipo de ligação glicosídica, configuração anomérica e substituintes. Mas a característica mais peculiar destes blocos de construção é sua natureza polifuncional, fornecendo diferentes posições para acoplamento do monossacarídeo adjacente, o que implica na possibilidade de ramificação da cadeia.[5,6]

Considerando apenas os dez monossacarídeos mais abundantes em mamíferos (Figura 1), mais de 100 mil estruturas trissacarídicas distintas são teoricamente viáveis, e esse número cresce dramaticamente com a extensão da cadeia. Apesar das numerosas combinações plausíveis, determinados padrões são comumente encontrados em produtos naturais, indicando que nem todas as possibilidades desse extenso conjunto são exploradas. Devido à abrangente importância dessas estruturas conservadas, derivados sintéticos mimetizando motivos sacarídicos podem ser empregados para estudo de alvos biológicos envolvidos em condições tão diversificadas como câncer, auto-imunidade, doenças parasitárias, infecção por vírus, etc.[6]

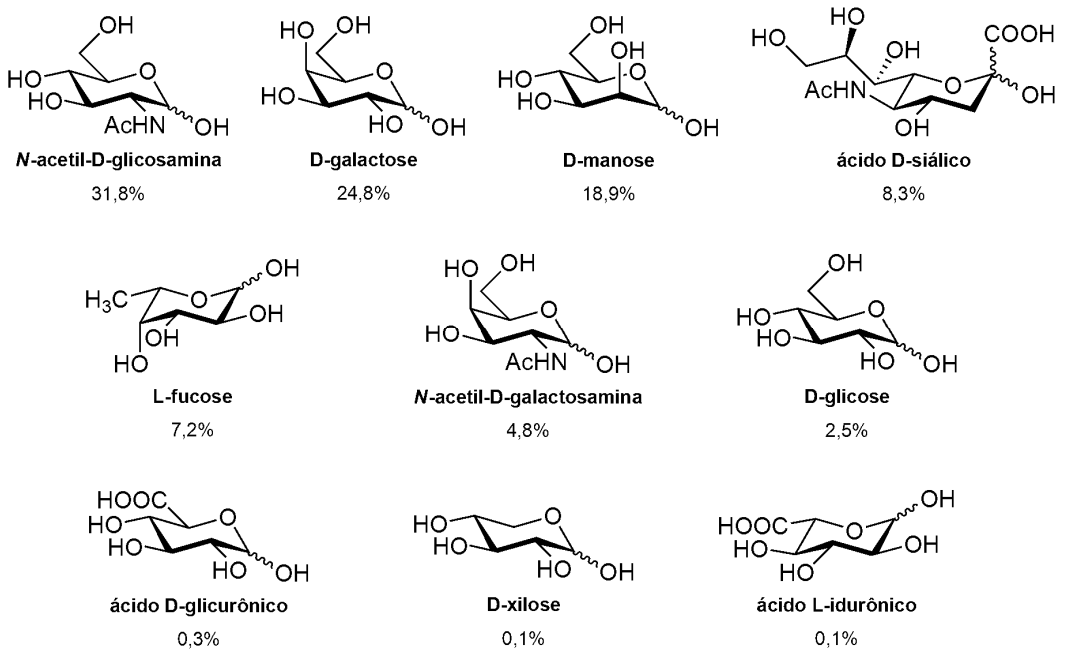


Figura 1. Monossacarídeos mais frequentes em glicoconjugados de mamíferos e respectivas abundâncias (em porcentagem) obtidas a partir da base de dados GLYCOSCIENCES.[6]

1.2 Glicoproteínas e mucinas

Glicosilação é um dos mecanismos mais comuns de modificação pós-traducional de proteínas, os quais são fundamentais para estrutura, estabilidade e função protéicas. O elaborado trabalho bioquímico em promover estas alterações é justificado pelas vantagens decorrentes da presença de domínios sacarídicos nestes biopolímeros, como estabilização conformacional, resistência à proteólise e biosseletividade. Não ao acaso, glicoproteínas são conjugados de ampla distribuição e importantes atividades biológicas, frequentemente atribuídas às glicanas.[1,3,7,8]

O-glicoproteínas figuram como uma das classes mais densamente glicosiladas. Apresentam oligossacarídeos covalentemente ligados a aminoácidos contendo cadeia lateral com grupo hidroxílico, como serina, treonina e mais raramente tirosina, hidroxiprolina, hidroxilisina, entre outros.[2] Particularmente as mucinas, *O*-glicoproteínas de peso molecular tão elevado quanto 1000 kDa, contendo até 80% da massa total em carboidratos, possuem motivos repetidos em *tandem* típicos, ricos em resíduos de serina (Ser) e treonina (Thr), que representam sítios potenciais para abundante *O*-glicosilação. Caracteristicamente, o resíduo sacarídico diretamente acoplado aos referidos aminoácidos é *N*-acetilgalactosamina em ligação α-glicosídica (α-GalNAc), também denominado antígeno Tn quando considerado juntamente com o aminoácido (Figura 2A).[9,10,11]

Mucinas estão presentes na superfície celular de numerosos tipos de tecidos epiteliais, a saber: vias respiratórias, sistema reprodutor, trato gastrintestinal e glândulas acessórias, onde exercem papel de proteção, hidratação e lubrificação. No entanto, suas propriedades vão muito além dessas funções primárias, dado que mucinas também estão envolvidas em processos biológicos complexos como renovação, diferenciação, sinalização e adesão celulares, fertilização, infecções e inflamação.[3,9,11,12]

O metabolismo desregulado de mucinas está associado a processos inflamatórios e muitos tipos de câncer, de tal forma que determinadas classes são empregadas como marcadores tumorais de relevância clínica, como MUC16 para câncer pancreático, hepático e ovariano. Adicionalmente, MUC1 e MUC4 são com frequência superexpressas em carcinomas ou expressas ectopicamente em outros neoplasmas e contribuem ativamente para o fenótipo maligno por induzir transformação celular, inibir apoptose e favorecer evasão do sistema imune. A maioria das neoplasias de origem epitelial apresenta expressão desregulada e/ou padrão de glicosilação aberrante de mucinas, que se relacionam com prognóstico desfavorável.[9]

A biossíntese de mucinas é regulada por diversos fatores, porém a inserção e o elongamento das glicanas estão sujeitos sobretudo ao controle das respectivas enzimas glicosiltransferases. A iniciação das cadeias oligossacarídicas depende da atividade da

enzima UDP-GalNAc:polipeptídeo *N*-acetilgalactosaminiltransferase (ppGalNAc-T), que reconhece as sequências de aminoácidos nas regiões repetidas em *tandem* das mucinas. A subsequente extensão da cadeia fica a cargo da ação sequencial de outras glicosiltransferases, cujas especificidade, localização, disponibilidade e atividade determinam o tipo de núcleo estrutural sacarídico formado.[7,9] As estruturas centrais dessas cadeias respeitam padrões conservados, abrangendo oito combinações distintas já identificadas, Motivo 1 a Motivo 8 (Figura 2B). A formação de glicanas mais complexas depende do perfil de glicosilação adicional desses núcleos, que varia conforme o tecido, estágio de desenvolvimento, situação fisiológica, entre outros.[3,10]

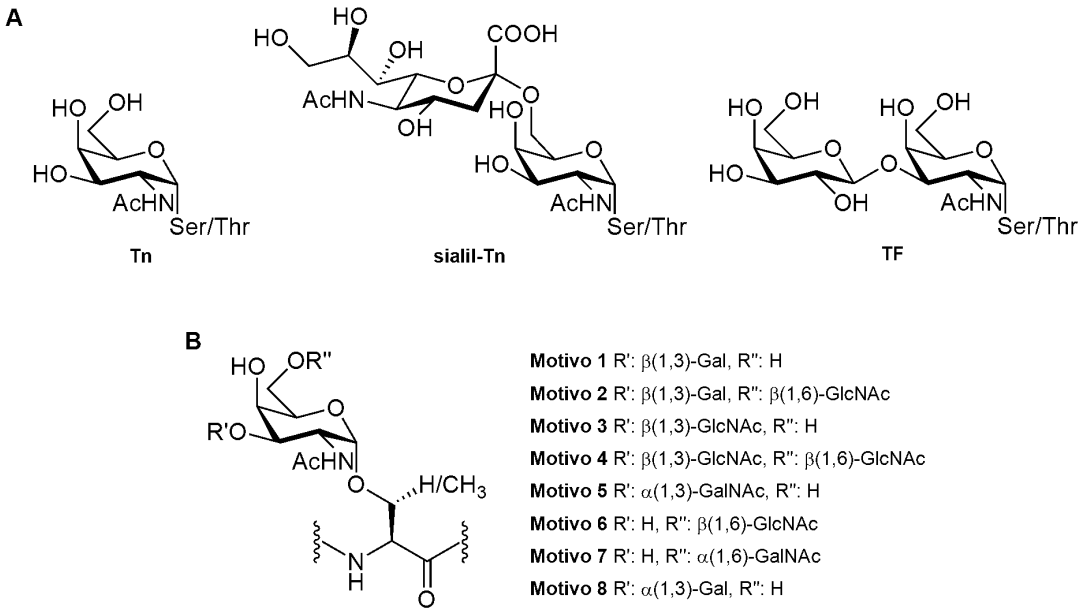


Figura 2. Estrutura de *O*-glicoproteínas. A) Antígenos carboidratos associados a tumor. B) Cadeias centrais de *O*-glicanas em mucinas.

Como os mecanismos biossintéticos em células malignamente transformadas são desregulados, também o processo de glicosilação de mucinas é comprometido, resultando em alta frequência de glicanas anormais, incompletas ou precocemente terminadas por sialilação. Logo, cadeias encurtadas como Tn, sialil-Tn e TF (Figura 2A) permanecem expostas em células tumorais, nas quais sua abundante expressão confere-lhes a classificação de antígenos carboidratos associados a tumor (TACA) com propriedades funcionais de adesão, invasão e metástase. Tais estruturas centrais, detectadas pela primeira vez justamente em mucinas, são usualmente encobertas por resíduos de açúcar adicionais em tecidos normais e constituem alvo seletivo promissor para investigação de *O*-glicopeptídeos no desenvolvimento de abordagens imunoterápicas contra o câncer.[2,3,7,11]

Muitas glicoproteínas atendem à classificação de "*mucin-like*", ou moléculas tipo mucina, termos que descrevem conjugados glicoprotéicos com propriedades estruturais e funcionais semelhantes às de mucinas clássicas, das quais se distinguem essencialmente

pelo tamanho. Sua massa molecular é comparativamente reduzida, variando entre 50 e 240 kDa, ainda que a composição geral de aminoácidos e sacarídeos seja mantida. Os sítios de glicosilação são maciçamente ocupados e ocorrem em sequências ricas também em prolina em adição aos resíduos de Thr e Ser. Devido ao elevado grau de analogia entre as referidas classes de *O*-glicanas, glicoproteínas tipo mucina são rotineiramente denotadas simplesmente por mucinas.[9,13]

Assim como mucinas de alto peso molecular, moléculas *mucin-like* também são glicoproteínas ancoradas na membrana celular que contribuem decisivamente em processos de reconhecimento e adesão. Glicoproteínas tipo mucina em leucócitos e células endoteliais promovem ligações cruzadas complementares como ligantes de selectinas, mediando a migração celular.[9] A frequente ocorrência de mucinas de baixo peso molecular na superfície de parasitas, desde protozoários até helmintos, é fundamental para o estabelecimento de parasitismo equilibrado, uma vez que tais mucinas são responsáveis simultaneamente pela interação com o hospedeiro e pela evasão da resposta imune.[7,12,13,14]

1.3 Doença de Chagas e a glicobiologia de *Trypanosoma cruzi*

Doença de Chagas é uma parasitose endêmica na América Latina e no sul dos Estados Unidos, com prevalência humana estimada em 8 a 10 milhões de infectados e quase 30 milhões de pessoas sob risco de infecção. 20 a 30% dos indivíduos chagásicos apresentam sintomas clínicos de fase crônica com morbidade associada a disfunções neurais, cardíacas e digestivas, e pelo menos 12.550 mil óbitos anuais ocorrem em decorrência da doença, resultando em grande impacto sobre a saúde pública.[14,15,16]

Apesar da denominação “tripanossomíase americana”, casos autóctones têm sido recentemente detectados em países de outros continentes, em particular Espanha, Austrália e Japão, e ainda Canadá e regiões não endêmicas dos Estados Unidos. Atribuída ao fluxo migratório em direção ao mundo desenvolvido, a expansão geográfica da doença, principalmente por transmissão transfusional, congênita ou via transplante de órgãos, motivou a Organização Mundial de Saúde a instituir em 2007 a “Rede Global pela Eliminação da Doença de Chagas”, iniciativa inédita que ressaltou a necessidade por vigilância epidemiológica, combate à transmissão inclusive não vetorial e abordagens diagnósticas e terapêuticas inovadoras.[16,17]

Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da Doença de Chagas, um protozoário flagelado que possui ciclo de vida heteroxênico com distintos estágios morfológicos (Figura 3A). No vetor hematófago *Triatoma infestans* são encontradas epimastigotas replicativas no intestino médio que originam tripomastigotas metacíclicas infectantes no final do tubo

digestivo. Quando depositadas sobre o hospedeiro vertebrado junto com as fezes do inseto durante o repasto sanguíneo, estas últimas formas evolutivas atingem a circulação através da solução de continuidade e invadem diversos tipos de células, onde se transformam em amastigotas. Após divisões binárias, diferenciam-se em tripomastigotas que são liberadas na corrente sanguínea mediante ruptura celular, podendo invadir outras células ou ser ingeridas por vetor triatomíneo para a continuidade do ciclo.[12,18]

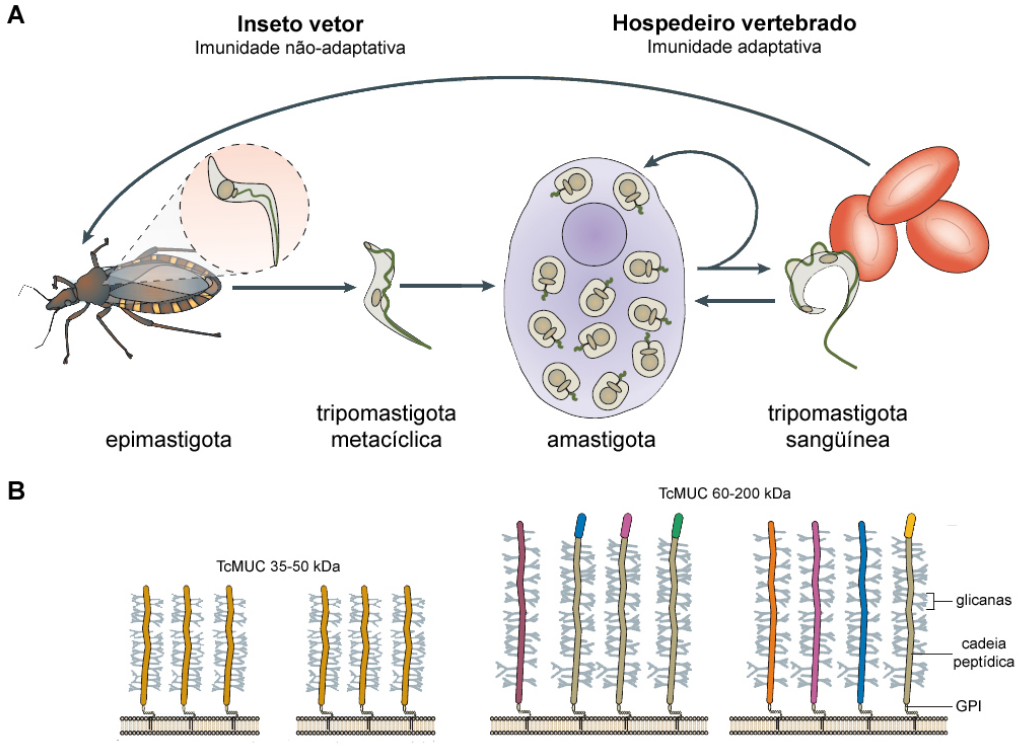


Figura 3. Características de *Trypanosoma cruzi*. A) Ciclo evolutivo esquemático ilustrando os principais estágios morfológicos do parasita. B) Mucinas parasitárias (TcMUC) representando a evolução da complexidade estrutural ao longo do ciclo. Adaptado.[12]

T. cruzi compreende um grupo variado de organismos, os quais apresentam diferentes cepas dentro de uma única espécie hospedeira. Como consequência, é observada uma grande variedade na patogenia e no desfecho clínico das infecções por este parasita. A superfície de *T. cruzi*, assim como a de muitos protozoários, é densamente recoberta por mucinas que atuam na interface entre o parasita e respectivos vetor ou hospedeiro, mediando tanto o direcionamento para invasão de células ou tecidos específicos quanto a evasão dos mecanismos de defesa. Cada estágio de evolução apresenta composição de mucinas característica, que determina distintas propriedades de adesão, proteção e imunogenicidade adaptadas ao ambiente biológico (Figura 3B).[9,12,13,14]

Tais mucinas parasitárias (TcMUC) compõem a principal classe de glicoproteínas de superfície em *T. cruzi*, contendo cadeias peptídicas de 50 a 200 aminoácidos ancoradas por

GPI e sequências ricas em Ser e principalmente Thr como sítios aceptores para *O*-glicosilação. A fração de glicanas contribui com até 60% da massa molecular desses glicoconjugados, conferindo um caráter hidrofílico e induzindo uma provável conformação estendida da proteína.[9,12,13,14]

Característica singular das mucinas de *T. cruzi* é a ocorrência de α-*N*-acetilglicosamina (α-GlcNAc) como primeiro monossacarídeo acoplado aos aminoácidos hidroxilados do segmento protéico (Figura 5A), inserido pela enzima parasita-específica UDP-GlcNAc:polipeptídeo *N*-acetilglicosaminiltransferase (ppGlcNAc-T). Por outro lado, unidades de α-GalNAc conectam os motivos sacarídicos às mucinas de vertebrados (Figura 2B), configurando uma importante diferença estrutural a ser explorada para desenvolvimento de agentes terapêuticos. Embora cerca de 20% de *O*-GlcNAc permaneçam sem substituição, as posições *O*-4 e *O*-6 são geralmente elongadas com até 5 unidades de galactose formando glicanas com grau de ramificação, configuração anomérica e tamanho de anel variáveis de acordo com a cepa e o estágio evolutivo.[12,13,14,19]

As mucinas de cepas Y e CL Brener apresentam oligossacarídeos contendo resíduo de β-Gal*p* ligado a GlcNAc *O*-4 (Figura 4A) e as cepas G e Dm28 apresentam resíduos β-Gal*f* nesta posição (Figura 4B). Por outro lado, as mucinas da cepa Tulahuen apresentam uma grande diversidade estrutural da biossíntese de *O*-glicanas, devido ao fato de expressarem duas famílias de *O*-oligossacarídeos resultantes da presença de resíduos de β-Gal*f* e β-Gal*p* ligados a GlcNAc *O*-4 (Figura 4C). A análise química estrutural destas espécies de oligossacarídeos e, consequentemente, as diferenças de expressão e atividade das glicosiltransferases envolvidas em seu processo de formação, podem estabelecer uma correlação entre a diversidade genética e a habilidade das cepas em apresentar grande variabilidade de virulência, levando à infecção de diferentes hospedeiros.[20]

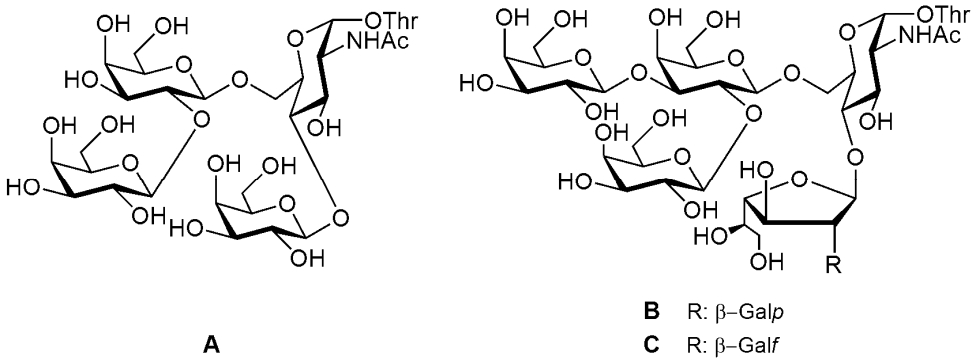


Figura 4. Estruturas de oligossacarídeos *O*-ligados presentes em mucinas de cepas Y e CL Brener (A), G e Dm28 (B), e Tulahuen (C), de *Trypanosoma cruzi*.

β-galactopiranosídeos são os resíduos mais comuns, e quando presentes em posição terminal são posteriormente decorados com ácido siálico no meio extracelular, pela ação da enzima *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi* (TcTS), específica do parasita. A

enzima responsável pela sialilação é também uma glicoproteína de superfície de *T. cruzi* fixada à membrana celular por âncora de GPI e codificada por dezenas de membros de uma superfamília com mais de mil genes. Devido à inabilidade do parasita em sintetizar ácido siálico, mais especificamente o derivado ácido *N*-acetilneuramínico, TcTS transfere este monossacarídeo a partir de glicoconjugados do hospedeiro para as mucinas parasitárias com retenção da configuração α-2,3 da ligação glicosídica (Figura 5B), diferindo dos demais organismos em que a sialilação depende de ácido siálico ligado a citosina monofosfato como doador. A atividade de TcTS é crucial para a viabilidade, infectividade e propagação do parasita, uma vez que a enzima promove adesão das formas tripomastigotas circulantes às células hospedeiras, confere resistência à cascata do complemento e protege contra lise mediada por anticorpos.[12,13,14,19,21]

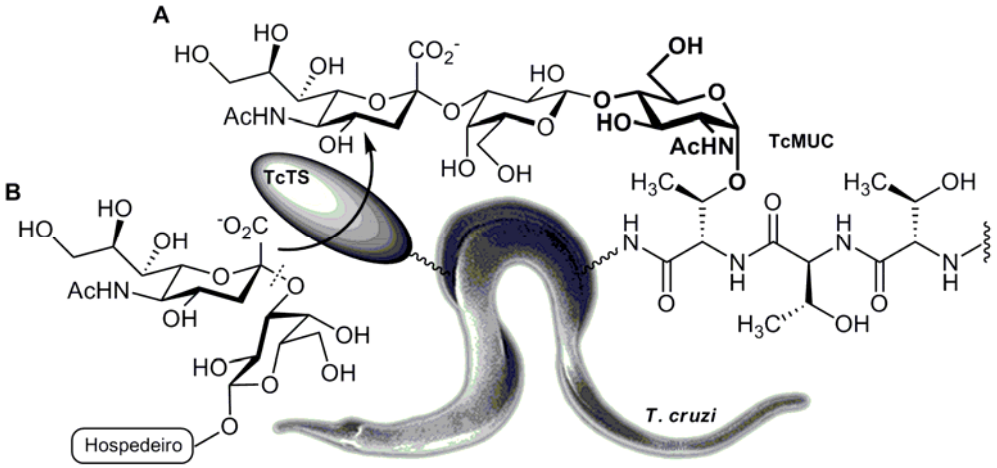


Figura 5. Glicoproteínas de superfície de *T. cruzi*. A) Mucina parasitária (TcMUC) com unidade de α-GlcNAc (em destaque) conectando a glicana à sequência peptídica de Thr.
B) Enzima *trans*-sialidase (TcTS) catalisando reação de transferência de ácido siálico.

Terminais não redutores α-galactosilados expressos nas mucinas de tripomastigotas sanguíneas são altamente imunogênicos para humanos e representam o alvo dos anticorpos tripanolíticos anti-α-Gal normalmente presentes no soro de pacientes chagásicos em fase aguda ou crônica, com elevada afinidade e ampla especificidade por epítopos de TcMUC.[13,18] Embora α-galactosídeos permaneçam expostos por não serem bons aceptores de TcTS,[22] a sialilação de terminais β-galactosídicos, interessantemente, confere resistência à lise por anticorpos anti-α-Gal, proteção atribuída ao efeito de repulsão de cargas que impede agregação das mucinas e colapso da membrana. Danos celulares ainda mais acentuados ocorrem na presença de anticorpos inibitórios anti-TcTS, que previnem a incorporação de ácido siálico.[23]

A crescente aceitação da hipótese de persistência do parasita como patogenia primária da Doença de Chagas, em detrimento da autoimunidade,[24,25] e a inexistência de tratamentos efetivos e seguros para todos os estágios da doença justificam a busca por estratégias inovadoras de eliminação do parasita.[26] Considerando as funções da sialilação em

T. cruzi para estrutura, adaptação a condições adversas, virulência e escape imunológico, é evidente a importância da *trans*-sialidase em seu ciclo de vida, que associada à presença exclusiva no parasita, faz desta enzima um alvo molecular seletivo. A descoberta de inibidores efetivos é fundamental para atender aos critérios de validação definitiva de TcTS como alvo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos contra a Doença de Chagas.[19,21]

Embora seja peculiar de *T. cruzi* a ocorrência de α-GlcNAc no terminal redutor dos oligossacarídeos conjugados às mucinas, métodos de imunodetecção por anticorpos monoclonais demonstraram a presença de estruturas contendo α-GalNAc-*O*-Ser/Thr em glicoproteínas de epimastigotas cultivadas. Tanto na superfície quanto em extratos do parasita, tais glicoaminoácidos foram encontrados sob a forma sialilada (sialil-Tn) mas não isoladamente (Tn), motivando especulação acerca da existência de uma *trans*-sialidase variante capaz de transferir ácido siálico para resíduos de α-GalNAc, hipótese razoável considerando as diversas mutações que conferem especificidade mais abrangente a TcTS. Adicionalmente, atividade ppGalNAc-T foi detectada em lisados parasitários através da transferência de UDP-GalNAc para um peptídeo sintético derivado de mucinas de *T. cruzi*, enquanto sequências peptídicas de mucinas humanas foram aceptores ruins. Mais estudos são necessários para estabelecer se a incorporação de α-GalNAc é devida a uma enzima específica ou trata-se de uma reação paralela catalisada pela mesma glicosiltransferase que normalmente adiciona α-GlcNAc às mucinas parasitárias.[27]

A expressão de mucinas com cadeias glicosídicas truncadas é amplamente distribuída em parasitas, sugerindo que não se trata de um fenômeno aberrante nesses organismos, em contraste com a natureza deletéria dessas alterações em mamíferos. Surpreendentemente, suas estruturas coincidem com as de antígenos associados a tumor como Tn e sialil-Tn, ao que se atribui a correlação negativa observada experimentalmente entre infecção por parasitas e malignidade.[27]

Camundongos em fase aguda ou subaguda de infecção por *T. cruzi* transplantados com células de linfoma apresentaram inibição de crescimento do tumor e da ocorrência de metástases, em relação aos animais que receberam as células cancerosas sem terem sido previamente infectados pelo parasita, sugerindo que o contato anterior com *T. cruzi* tenha causado imunidade cruzada com o linfoma.[28] Ratos em fase crônica de infecção por *T. cruzi* tratados com dimetilhidrazina (DMH), uma substância conhecida por sua propriedade de induzir câncer de cólon, tiveram menor incidência desta neoplasia quando comparados aos animais expostos a DMH que não tiveram contato prévio do parasita.[15] Presumivelmente, se parasitas e tumores compartilham antígenos semelhantes, a produção de anticorpos contra o parasita pode induzir imunidade cruzada efetiva contra as células cancerosas, fazendo desta associação um importante modelo para elucidar os mecanismos de supressão da tolerância imunológica e beneficiar as estratégias terapêuticas antitumorais.[7]

1.4 Vacinas sintéticas de carboidratos como imunoterapia contra o câncer

Por mais de um século, o emprego de técnicas de imunização tem contribuído significativamente para a saúde humana. O desenvolvimento de vacinas, ainda que bem sucedido, foi classicamente baseado em tentativas e erros, em investigações desprovidas de conhecimento molecular sobre o funcionamento do sistema imunológico. A progressiva elucidação dos mecanismos envolvidos na resposta imune vem tornando cada vez mais importante o papel da síntese química no desenho racional e otimização de agentes para intervenção nesses processos. Vacinologia reversa designa a caracterização de epítopos reconhecidos por anticorpos neutralizantes para um determinado antígeno visando a direcionar o desenvolvimento de candidatos efetivos a vacinas. Estabelecido o alvo, estruturas menores e sinteticamente acessíveis podem ser construídas para mimetizar apenas regiões epitópicas importantes, permitindo a focalização da reação imunológica.[29]

A seleção de antígenos de agentes infecciosos é realizada com relativa facilidade pesquisando o soro de indivíduos previamente expostos ao patógeno, já que suas estruturas são estranhas ao organismo humano e portanto imunogênicas. Vacinas sintéticas contra *Haemophilus influenzae* B e *Plasmodium falciparum* estão, respectivamente, em uso corrente ou em testes clínicos avançados. Inversamente, devido ao caráter próprio das células cancerígenas, imunoglobulinas naturais contra antígenos tumorais não são geralmente encontradas em indivíduos com câncer, dificultando a escolha de alvos para o desenvolvimento de vacinas. Dentre os antígenos tumorais já identificados, carboidratos são considerados os alvos mais apropriados e clinicamente relevantes para indução de imunidade ativa.[30,31]

Isoladamente, carboidratos antigênicos desencadeiam resposta imune independente de células T através da ativação direta de linfócitos B, resultando na produção de anticorpos unicamente IgM com baixa afinidade. Para viabilizar sua aplicação como vacinas, haptenos sacarídicos são conjugados a proteínas ou peptídeos carreadores imunogênicos, como albumina sérica bovina (BSA), hemocianina do caranguejo *Megathura crenulata* (KLH, "*keyhole limpet hemocyanin*") ou peptídeo derivado de poliovírus (PV), garantindo a estimulação de linfócitos T, os quais não reconhecem antígenos intactos mas são sensibilizados por fragmentos peptídicos antigênicos processados e expostos via complexo de histocompatibilidade principal (MHC). Além de estimular a resposta carboidrato-específica de células T citotóxicas, esta estratégia ativa células T auxiliadoras, que liberam citocinas indutoras da troca de isotipo e da maturação de afinidade das imunoglobulinas produzidas pelas células B. Linfócitos citotóxicos e anticorpos direcionados contra antígenos tumorais sintéticos são capazes de reconhecer os correspondentes epítopos nativos em células malignas circulantes e metastáticas, promovendo a erradicação das mesmas e

protegendo contra crescimento e recorrência tumoral, o que comprova o potencial de vacinas sintéticas de carboidratos para o combate ao câncer.[3,29,32,33]

Muitos antígenos glicoprotéicos e glicolipídicos associados a tumor, como Tn, sialil-Tn, TF, Lewis, KH-1, globo H e gangliosídeos, têm sido adotados como alvos para desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra o câncer, uma vez que sua ocorrência em tecidos normais é restrita.[33] Elevado nível de expressão de tais antígenos na superfície de células cancerosas correlaciona-se com prognóstico alarmante, contudo a vacinação baseada em epítopos sintéticos associados a tumor explora exatamente essa característica para dirigir o sistema imune a fim de gerar uma reação tumor-seletiva.[3]

O antígeno Tn, particularmente, apresenta notáveis amplitude e intensidade de expressão em carcinomas, estando associado a vários tipos de câncer como de mama, ovário, próstata, cólon, pulmão e pâncreas.[33] Além de diversas evidências pré-clínicas de efetividade,[33,34,35] vacinas sintéticas conjugadas contendo Tn têm obtido sucesso em testes clínicos,[30] entre os quais se destaca um ensaio de fase I em que pacientes com câncer prostático reincidente foram imunizados com *clusters* de Tn conjugados a KLH em associação com o adjuvante imunológico QS21. Houve produção de elevados títulos de anticorpos IgM e IgG específicos e efeito antitumoral mensurável com base na diminuição do antígeno prostático específico (PSA, *prostate specific antigen*) sérico, cujos níveis se relacionam diretamente com a progressão radiográfica do tumor.[36]

De acordo com a natureza da molécula carreadora utilizada, estratégias variadas de conjugação estão disponíveis para o antígeno Tn. Quando são empregados oligopeptídeos imunogênicos sintéticos, o bloco de glicoaminoácido pode ser diretamente incorporado ao terminal amino ao final da sequência de acoplamentos em fase sólida (Figura 6A[34]). A conjugação com carreadores protéicos macromoleculares envolve a introdução de cadeias espaçadoras ao antígeno Tn e a derivatização de funções laterais de resíduos superficiais da proteína, predominantemente lisina (Lys), de modo a promover ligação química entre estes grupos (Figura 6B[35] e Figura 6C[37]). Alternativamente, a substituição do aminoácido do antígeno Tn por resíduos hidroxilados não naturais (Figura 6D[33] e Figura 6E[31]) produz análogos com imunogenicidade e resistência à degradação *in vivo* potencialmente maiores e permite dispensar o uso de espaçadores conforme o grau de extensão da cadeia lateral em relação a Ser e Thr. Abordagens ainda mais elaboradas exploram a multivalência para melhorar a imunogenicidade dos conjugados através da maior semelhança com a superfície de células cancerosas, as quais tendem a expressar os antígenos tumorais em série. Dendrímeros, *clusters* triméricos de Tn ou mesmo construções monomoleculares contendo até sete antígenos tumorais distintos são os avanços mais recentes, assegurando novas perspectivas de aplicação às vacinas sintéticas.[30,38]

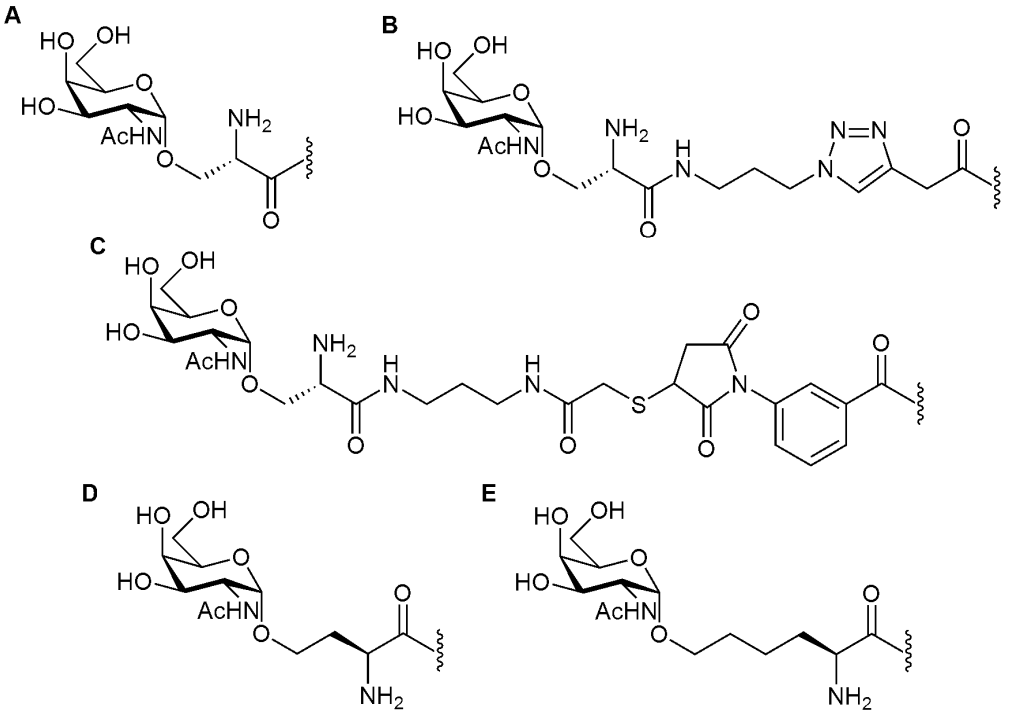


Figura 6. Ligantes para conjugação do antígeno Tn a moléculas carreadoras. A) Tn diretamente conjugado. B) Tn conjugado via triazol (ligação entre grupos $–N_3$ e –C≡CH por "*click chemistry*"). C) Tn conjugado via *N*-benzoil-succinamida (ligação entre grupos –SH e $–NH_2$). D) α-GalNAc ligado a resíduo de homoserina. E) α-GalNAc ligado a resíduo de hidroxinorleucina.

1.5 Síntese de glicoaminoácidos, glicopeptídeos e glicodicetopiperazinas

A investigação das funções biológicas desempenhadas por glicoproteínas requer quantidades suficientes de compostos puros e com estrutura exatamente definida. A disponibilidade escassa e a microheterogeneidade destes glicoconjugados em matérias-primas naturais inviabilizam sua obtenção a partir destas fontes. O processo de glicosilação *in vivo* é pós-traducional, resultando em numerosas glicoformas prontamente inacessíveis por tecnologia genética. Portanto, a ferramenta mais adequada para obtenção de quantidades razoáveis de glicopeptídeos homogêneos e bem caracterizados é a síntese orgânica.[3,39,40,41] Tanto em solução como em fase sólida, o método mais eficiente e versátil para a preparação de *O*-glicopeptídeos, incluindo os relacionados a mucinas, emprega aminoácidos glicosilados protegidos como blocos de construção para etapas de acoplamento sucessivas. Tais blocos são obtidos pela reação direta do aminoácido *N*- e *O*-protegido com um doador glicosídico.[3,31,40,41]

Grupos de proteção ortogonais são necessários tanto para o carboidrato quanto para o aminoácido, garantindo condições brandas de desproteção após o elongamento do glicopeptídeo. O terminal carboxílico do aminoácido é protegido por grupos como *O*-Bn ou *O*-Pfp, enquanto *N*-Fmoc é usado para proteção da função amino, sendo removido pelas bases

piperidina ou morfolina em condições controladas, uma vez que unidades sacarídicas *O*-ligadas a Ser ou Thr tendem a sofrer β-eliminação catalisada por bases. Por outro lado, a ligação *O*-glicosídica é sensível a condições ácidas e os grupos *O*- e *N*-acetil usados para a proteção do sacarídeo contribuem para a estabilização da função acetal. O emprego de outros grupos de proteção e sua manipulação conveniente permite ainda controle régio- e estéreo-seletivo.[3,40,41]

A estereoseletividade da glicosilação é influenciada pelo substituinte da posição *C*-2 do doador glicosídico. Funções aciladas, como acetil ou benzoil, nesta posição induzem a participação de grupo vizinho com formação de intermediário oxazolina durante a ativação da posição anomérica e promovem glicosilação 1,2-*trans* seletiva, geralmente resultando em β-glicosídeos. Opostamente, grupos não participantes em *C*-2, como éter benzílico ou azida, originam o correspondente α-glicosídeo, favorecido pelo efeito anomérico.[3,4,5]

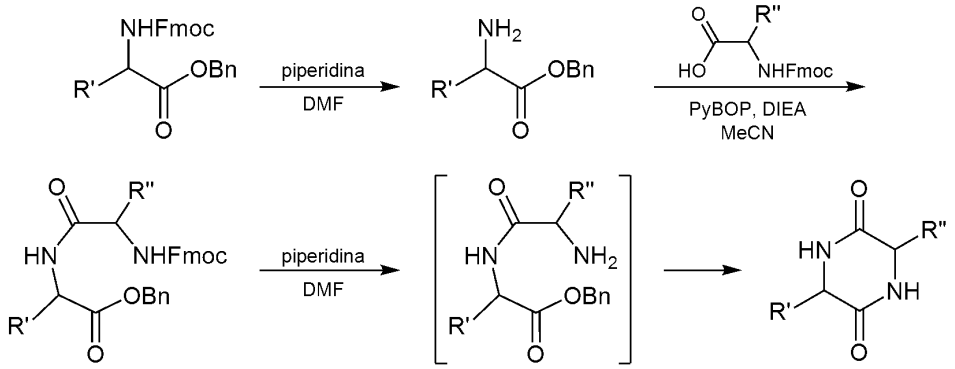
A síntese de glicoaminoácidos do tipo mucina, particularmente α-GalNAc-Ser/Thr, é baseada na introdução de uma função nitrogenada latente na posição *C*-2, sendo que o grupo azida é preferido por ser não participante e dirigir o ataque do aceptor glicosídico resultando em configuração anomérica α, além ser facilmente convertido a acetamido após a glicosilação. A introdução da função azida é predominantemente realizada pela clássica reação de azidonitração de galactal, geralmente seguida de halogenação anomérica e glicosilação sob condições de Koenigs-Knorr.[3,5,11,42,43] Apesar dessa estratégia implicar em rotas sintéticas extensas, outras opções disponíveis são empregadas com menor frequência, destacando-se a adição do tipo Michael a 2-nitrogalactal[10] como a alternativa mais versátil e eficiente. Nas reações de glicosilação, uma variedade de grupos abandonadores anoméricos são utilizados, incluindo tricloroacatimidatos[31], cloretos[33], brometos[35], tioglicosídeos[44] e pentenilglicosídeos[45] ativados por sais de prata, ácidos de Lewis ou eletrófilos *soft*.[3,5,11,46]

Os aminoácidos glicosilados protegidos obtidos são blocos de construção para a síntese de glicopeptídeos, baseada em ciclos de desproteção de *N*-Fmoc da extremidade amino seguida do acoplamento usando excesso de glicoaminoácido ou aminoácido, cuja função carboxílica é ativada por reagentes de acoplamento, mais comumente PyBOP, DIC/HOBt e TBTU, formando de ésteres reativos. O glicopeptídeo livre, com sequência primária e posições de glicosilação definidas, é fornecido pela desproteção total da cadeia e, quando sintetizado em fase sólida, após sua clivagem da resina. Ainda que este protocolo apresente elevados rendimentos, uma fonte comum de perdas é a formação de dicetopiperazinas (DKPs) por ciclização intramolecular principalmente quando há resíduos *C*-terminais de glicina, alanina ou prolina.[3,35,46,47]

Em certos casos, contudo, a formação de DKPs é desejável. Glicopeptídeos, assim como outros oligômeros biológicos, podem assumir diversas conformações sob a forma linear, das quais apenas uma limitada fração apresenta função biológica, o que torna a restrição conformacional útil para incrementar sua atividade, sendo a ciclização a estratégia mais

comum. Além da rigidez conformacional conferida pelo anel, peptídeos cíclicos possuem outras vantagens em relação aos análogos lineares, incluindo maior biodisponibilidade e estabilidade metabólica, mantendo as características das ligações peptídicas. São diversas as metodologias para obtenção sintética de DKPs clássicas, principalmente em fase sólida, mas como a combinação deste núcleo heterocíclico versátil com carboidratos ainda é pouco explorada, constitui uma inovação promissora para a química de glicopeptídeos,[8,47]

Uma das metodologias sintéticas disponíveis para obtenção de dicetopiperazinas foi desenvolvida pelo próprio grupo de pesquisa em trabalhos anteriores[48] e está fundamentada no acoplamento de aminoácidos protegidos com subsequente ciclização intramolecular espontânea do dipeptídeo mediante clivagem do grupo de *N*-proteção e posterior eliminação do grupo protetor carboxílico (Esquema 1). Partindo de aminoácidos convenientemente funcionalizados, praticamente qualquer substituinte de interesse pode ser incorporado ao núcleo dicetopiperazínico, incluindo carboidratos, sendo uma versátil estratégia para carreamento e apresentação de farmacóforos para aumentar seletividade e afinidade por alvos biológicos.[48]



Esquema 1. Síntese genérica de dicetopiperazinas a partir da ciclização de dipeptídeos. R' e R'': substituintes.

O papel biológico abrangente e complexo de carboidratos sob a forma de glicoconjugados aponta para inúmeras possibilidades de intervenção farmacológica, ainda incompletamente aproveitada para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas. Em particular as mucinas, glicoproteínas relevantes em patologias significativas como parasitismo e câncer, representam um alvo privilegiado para descoberta de novos agentes capazes de interferir em tais processos de forma tanto preventiva quanto curativa. Neste contexto, a síntese de glicoaminoácidos e glicopeptídeos relacionados a mucinas adquire especial importância para a obtenção de análogos puros e estruturalmente definidos a fim de contribuir para a melhor compreensão dos fenômenos modulados por mucinas bem como explorar seu potencial terapêutico.

Experiência prévia na síntese de glicodicetopiperazinas[48] e simulações de *docking*[49] envolvendo o sítio ativo de TcTS conduziram ao planejamento dos compostos dicetopiperazínicos com resíduos de GalNAc **1** e **2** como potenciais inibidores desta enzima e análogos do antígeno tumoral Tn.

5 CONCLUSÕES

As rotas sintéticas propostas forneceram com sucesso os blocos de construção intermediários e o precursor direto (somente protegido) da glicodicetopiperazina **1**, embora a síntese do composto **2** não tenha sido completada por limitação da quantidade do gllicoaminoácido intermediário.

Reações de glicosilação promovidas por $HgBr_2$ foram testadas e comprovaram a eficiência deste catalisador para a combinação de doadores e aceptores empregada, diversificando as aplicações deste promotor. Os rendimentos obtidos foram comparáveis aos métodos de glicosilação clássicos, apresentando ainda algumas vantagens.

As reações de acoplamento de glicoaminoácidos e subsequente ciclização foram efetivas pelos protocolos propostos, gerando cinco glicodipeptídeos e três glicodicetopiperazinas (incluindo **1**), todos inéditos na literatura.

Ensaios de cinética enzimática em TcTS com os intermediários **19** e **20** (derivados de α-GalNAc) indicaram elevada inibição, maior até que os inibidores conhecidos da enzima utilizados como controle. Esses resultados promissores direcionam para a continuidade do estudo desses compostos intermediários, e dos produtos finais quando obtidos, em ensaios tripanocidas.

Ensaios e citotoxicidade sobre células tumorais evidenciaram forte atividade dos compostos **19** e **20** sobre a linhagem Jurkat, que expressa o antígeno Tn, enquanto a atividade citotóxica dos compostos sobre a linhagem B16F10, que não expressa o antígeno, foi baixa. Os mecanismos responsáveis por essas diferentes respostas ficam por ser elucidados.

REFERÊNCIAS

1. DOORES, K. J.; GAMBLIN, D. P.; DAVIS, B. G. Exploring and exploiting the therapeutic potential of glycoconjugates. **Chemistry - A European Journal**, v. 12, n. 3, p. 656-665, 2006.

2. HOLEMANN, A.; SEEBERGER, P. H. Carbohydrate diversity: synthesis of glycoconjugates and complex carbohydrates. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 6, p. 615-622, 2004.

3. BROCKE, C.; KUNZ, H. Synthesis of tumor-associated glycopeptide antigens. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 10, p. 3085-3112, 2002.

4. SEEBERGER, P. H.; WERZ, D. B. Synthesis and medical applications of oligosaccharides. **Nature**, v. 446, n. 7139, p. 1046-1051, 2007.

5. BONGAT, A. F. G.; DEMCHENKO, A. V. Recent trends in the synthesis of O-glycosides of 2-amino-2-deoxysugars. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 3-4, p. 374-406, 2007.

6. WERZ, D. B.; RANZINGER, R.; HERGET, S.; ADIBEKIAN, A.; VON DER LIETH, C.; SEEBERGER, P. H. Exploring the Structural Diversity of Mammalian Carbohydrates ("Glycospace") by Statistical Databank Analysis. **ACS Chemical Biology**, v. 2, n. 10, p. 685-691, 2007.

7. OSINAGA, E. Expression of cancer-associated simple mucin-type O-glycosylated antigens in parasites. **IUBMB Life**, v. 59, n. 4-5, p. 269-273, 2007.

8. CHEN, J.; WARREN, J. D.; WU, B.; CHEN, G.; WAN, Q.; DANISHEFSKY, S. J. A route to cyclic peptides and glycopeptides by native chemical ligation using in situ derived thioesters. **Tetrahedron Letters**, v. 47, n. 12, p. 1969-1972, 2006.

9. ANDRIANIFAHANANA, M.; MONIAUX, N.; BATRA, S. K. Regulation of mucin expression: Mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. **Biochimica et Biophysica Acta, Reviews on Cancer**, 1765(2), p. 189-222, 2006.

10. GEIGER, J.; REDDY, B. G.; WINTERFELD, G. A.; WEBER, R.; PRZYBYLSKI, M.; SCHMIDT, R. R. Glycal Glycosylation and 2-Nitroglycal Concatenation, a Powerful Combination for Mucin Core Structure Synthesis. **Journal of Organic Chemistry**, v. 72, n. 12, p. 4367-4377, 2007.

11. WINTERFELD, G. A.; KHODAIR, A. I.; SCHMIDT, R. R. O-glycosyl amino acids by 2-nitrogalactal concatenation - synthesis of a mucin-type O-glycan. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 6, p. 1009-1021, 2003.

12. BUSCAGLIA, C. A.; CAMPO, V. A.; FRASCH, A. C. C.; DI NOIA, J. M. Trypanosoma cruzi surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nature Reviews, Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 229-236, 2006.

13. ACOSTA-SERRANO, A.; ALMEIDA, I. C.; FREITAS-JUNIOR, L. H.; YOSHIDA, N.; SCHENKMAN, S. The mucin-like glycoprotein superfamily of Trypanosoma cruzi: Structure and biological roles. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 114, n. 2, p. 143-150, 2001.

14. CAMPO, V. L.; CARVALHO, I.; ALLMAN, S.; DAVIS, B. G.; FIELD, R. A. Chemical and chemoenzymatic synthesis of glycosyl-amino acids and glycopeptides related to Trypanosoma cruzi mucins. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 5, n. 16, p. 2645-2657, 2007.

15. OLIVEIRA, E. C.; LEITE, M. S. B.; MIRANDA, J. A. R.; ANDRADE, A. L. S. S.; GARCIA, S. B.; LUQUETTI, A. O.; MOREIRA, H. Chronic Trypanosoma cruzi infection associated with low incidence of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 5, p. 737-740, 2001.

16. Organização Mundial de Saúde. Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas**.** 2005. Buenos Aires. *OMS*, **2007**.

17. Instituto Oswaldo Cruz. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=322&sid=32>. Acesso em: 28 fev. 2008. **IOC**, 2008.

18. ALMEIDA, I. C.; FERGUSON, M. A.; SCHENKMAN, S.; TRAVASSOS, L. R. Lytic anti-α-galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease, recognize novel O-linked oligosaccharides on mucin-like glycosyl-phosphatidylinositol-anchored glycoproteins of Trypanosoma cruzi. **Biochemical Journal**, v. 304, n. 3, p. 793-802, 1994.

19. AGUSTI, R.; MENDOZA, V. M.; GALLO-RODRIGUEZ, C.; DE LEDERKREMER, R. M. Selective sialylation of 2,3-di-O-(β-D-galactopyranosyl)-D-galactose catalyzed by Trypanosoma cruzi trans-sialidase. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 16, n. 2, p. 541-551, 2005.

20. MENDONCA-PREVIATO, L.; TODESCHINI, A. R.; HEISE, N.; AGRELLOS, O. A.; DIAS, W. B.; PREVIATO, J. O. Chemical structure of major glycoconjugates from parasites. **Current Organic Chemistry**, v. 12, n. 11, p. 926-939, 2008.

21. NERES, J.; BRYCE, R. A.; DOUGLAS, K. T. Rational drug design in parasitology: trans-sialidase as a case study for Chagas disease. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 3-4, p. 110-117, 2008.

22. SINGH, S.; SCIGELOVA, M.; HALLBERG, M. L.; HOWARTH, O. W.; CROUT, D. H. G.; SCHENKMAN, S. Synthesis of sialyloligosaccharides using the trans-sialidase from Trypanosoma cruzi: novel branched and di-sialylated products from digalactoside acceptors. **Chemical Communications**, v. 12, p. 1013-1014, 2000.

23. PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; ACOSTA-SERRANO, A.; DE ALMEIDA, I. C.; FERGUSON, M. A. J.; SOUTO-PADRON, T.; RODRIGUES, M. M.; TRAVASSOS, L. R.; SCHENKMAN, S. Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects Trypanosoma cruzi trypomastigotes from killing by human anti-α-galactosyl antibodies. **Journal of Cell Science**, v. 113, n. 7, p. 1299-1307, 2000.

24. BURLEIGH, B. A.; WOOLSEY, A. M. Cell signalling and Trypanosoma cruzi invasion. **Cellular Microbiology**, v. 4, n. 11, p. 701-711, 2002..

25. TARLETON, R. L. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5-6, p. 550-554, 2001.

26. BUSCHIAZZO, A.; AMAYA, M. F.; CREMONA, M. L.; FRASCH, A. C.; ALZARI, P. M. The crystal structure and mode of action of trans-sialidase, a key enzyme in Trypanosoma cruzi pathogenesis. **Molecular Cell**, v. 10, n. 4, p. 757-768, 2002.

27. FREIRE, T.; ROBELLO, C.; SOULE, S.; FERREIRA, F.; OSINAGA, E. Sialyl-Tn antigen expression and O-linked GalNAc-Thr synthesis by Trypanosoma cruzi. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 312, n. 4, p. 1309-1316, 2003.

28. MEL'NIKOV, V. G.; FIERRO, V. F. H.; DOBROVINSKAYA, O. R. Suppression of growth and metastasizing of T-cell lymphoma in mice infected with american trypanosomiasis at different stages of experimental infection. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 137, n. 5, p. 475-478, 2004.

29. ROBINSON, J. A. Horizons in chemical immunology - approaches to synthetic vaccine design. **Chimia**, v. 61, n. 3, p. 84-92, 2007.

30. SLOVIN, S. F.; KEDING, S. J.; RAGUPATHI, G. Carbohydrate vaccines as immunotherapy for cancer. **Immunology and Cell Biology**, v. 83, n. 4, p. 418-428, 2005.

31. KEDING, S. J.; ENDO, A.; DANISHEFSKY, S. J. Synthesis of non-natural glycosylamino acids containing tumor-associated carbohydrate antigens. **Tetrahedron**, v. 59, n. 35, p. 7023-7031, 2003.

32. MEINJOHANNS, E.; MELDAL, M.; JENSEN, T.; WERDELIN, O.; GALLI-STAMPINO, L.; MOURITSEN, S.; BOCK, K. Versatile solid-phase thiolytic reduction of azido and N-Dts groups in the synthesis of hemoglobin (67-76) O-glycopeptides and photoaffinity labeled analogs to study glycan T-cell specificity. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry**, n. 6, p. 871-884, 1997.

33. VICHIER-GUERRE, S.; LO-MAN, R.; HUTEAU, V.; DERIAUD, E.; LECLERC, C.; BAY, S. Synthesis and immunological evaluation of an antitumor neoglycopeptide vaccine bearing a novel homoserine Tn antigen. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 13, p. 3567-3570, 2004.

34. LO-MAN, R.; VICHIER-GUERRE, S.; PERRAUT, R.; DERIAUD, E.; HUTEAU, V.; BENMOHAMED, L.; DIOP, O. M.; LIVINGSTON, P. O.; BAY, S.; LECLERC, C. A Fully Synthetic Therapeutic Vaccine Candidate Targeting Carcinoma-Associated Tn Carbohydrate Antigen Induces Tumor-Specific Antibodies in Nonhuman Primates. **Cancer Research**, v. 64, n. 14, p. 4987-4994, 2004.

35. KUDUK, S. D.; SCHWARZ, J. B.; CHEN, X.; GLUNZ, P. W.; SAMES, D.; RAGUPATHI, G.; LIVINGSTON, P. O.; DANISHEFSKY, S. J. Synthetic and immunological studies on clustered modes of mucin-related Tn and TF O-linked antigens: The preparation of a glycopeptide-based vaccine for clinical trials against prostate cancer. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 48, p. 12474-12485, 1998.

36. SLOVIN, S. F.; RAGUPATHI, G.; MUSSELLI, C.; OLKIEWICZ, K.; VERBEL, D.; KUDUK, S. D.; SCHWARZ, J. B.; SAMES, D.; DANISHEFSKY, S.; LIVINGSTON, P. O.; SCHER, H. I. Fully synthetic carbohydrate-based vaccines in biochemically relapsed prostate cancer: clinical trial results with α-N-acetylgalactosamine-O-serine/threonine conjugate vaccine. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 23, p. 4292-4298, 2003.

37. WAN, Q.; CHEN, J.; CHEN, G.; DANISHEFSKY, S. J. A potentially valuable advance in the synthesis of carbohydrate-based anticancer vaccines through extended cycloaddition chemistry. **Journal of Organic Chemistry**, v. 71, n. 21, p. 8244-8249, 2006.

38. CUNTO-AMESTY, G.; MONZAVI-KARBASSI, B.; LUO, P.; JOUSHEGHANY, F.; KIEBER-EMMONS, T. Strategies in cancer vaccines development. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 5-6, p. 597-613, 2003.

39. DAVIS, B. G. Synthesis of Glycoproteins. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 2, p. 579-601, 2002.

40. LIU, M.; YOUNG, V. G.; LOHANI, S.; LIVE, D.; BARANY, G. Syntheses of TN building blocks N^{α}-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-azido-2-deoxy-α-L-galactopyranosyl)-L-serine/L-threonine pentafluorophenyl esters: comparison of protocols and elucidation of side reactions. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 7, p. 1273-1285, 2005.

41. ARSEQUELL, G.; VALENCIA, G. O-Glycosyl α-amino acids as building blocks for glycopeptide synthesis. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 8, n. 17, p. 2839-2876, 1997.

42. CAMPO, V. L.; CARVALHO, I. Synthesis of glycosyl-amino acids of biological interest. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1027-1033, 2008.

43. LEMIEUX, R. U.; RATCLIFFE, R. M. The azidonitration of tri-O-acetyl-D-galactal. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 57, n. 10, p. 1244-1251, 1979.

44. ELOFSSON, M.; KIHLBERG, J. Synthesis of Tn and sialyl Tn building blocks for solid phase glycopeptide synthesis. **Tetrahedron Letters**, v. 36, n. 41, p. 7499-502, 1995.

45. SVAROVSKY, S. A.; BARCHI, J. J. Highly efficient preparation of tumor antigen-containing glycopeptide building blocks from novel pentenyl glycosides. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 19, p. 1925-1935, 2003.

46. DZIADEK, S.; KUNZ, H. Synthesis of tumor-associated glycopeptide antigens for the development of tumor-selective vaccines. **Chemical Record**, v. 3, n. 6, p. 308-321, 2004.

47. MARTINS, M. B.; CARVALHO, I. Diketopiperazines: biological activity and synthesis. **Tetrahedron**, v. 63, n. 40, p. 9923-9932, 2007.

48. CAMPO, V. L.; MARTINS, M. B.; DA SILVA, C. H. T. P.; CARVALHO, I. Novel and facile solution-phase synthesis of 2,5-diketopiperazines and *O*-glycosylated analogs. **Tetrahedron**, v. 65, n. 27, p. 5343-5349, 2009.

49. NISSINK, J. W. M.; MURRAY, C.; HARTSHORN, M.; VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; TAYLOR, R. A new test set for validating predictions of protein-ligand interaction. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, v. 49, n. 4, p. 457-471, 2002.

50. PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F.; PERRIN, D. R. **Purification of laboratory chemicals**. 2nd ed. New York: Pergamon Press, 1980.

51. NERES, J.; BUSCHIAZZO, A.; ALZARI, P. M.; WALSH, L.; DOUGLAS, K. T. Continuous fluorimetric assay for high-throughput screening of inhibitors of trans-sialidase from Trypanosoma cruzi. **Analytical Biochemistry**, v. 357, n. 2, p. 302-304, 2006.

52. MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

53. JUARISTI, E.; CUEVAS, G. Recent studies on the anomeric effect. **Tetrahedron**, v. 48, n. 24, p. 5019-5087, 1992.

54. MYDOCK, L. K.; DEMCHENKO, A. V. Mechanism of chemical *O*-glycosylation: from early studies to recent discoveries. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 8, n. 17, p. 497-510, 2010.

55. MITCHELL, S. A.; PRATT, M. R.; HRUBY, V. J.; POLT, R. Solid-Phase Synthesis of O-Linked Glycopeptide Analogues of Enkephalin. **Journal of Organic Chemistry**, v. 66, n. 7, p. 2327-2342, 2001.

56. WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, p. 211-215, 1963.

57. KARTHA, K. P.; FIELD, R. A. Iodine: a versatile reagent in carbohydrate chemistry. IV. Per-O-acetylation, regioselective acylation and acetolysis. **Tetrahedron**, v. 53, n. 34, p. 11753-11766, 1997.

58. KARKKAINEN, T. S.; RAVINDRANATHAN-KARTHA, K. P.; MACMILLAN, D.; FIELD, R. A. Iodine-mediated glycosylation en route to mucin-related glyco-aminoacids and glycopeptides. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 10-11, p. 1830-1834, 2008.

59. TRAHANOVSKY, W. S.; ROBBINS, M. D. Oxidation of organic compounds with cerium(IV). XIV. Formation of a α-azido-β-nitratoalkanes from olefins, sodium azide, and ceric ammonium nitrate. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, n. 20, p. 5256-5258, 1971.

60. BANOUB, J.; BOULLANGER, P.; LAFONT, D. Synthesis of oligosaccharides of 2-amino-2-deoxy sugars. **Chemical Reviews**, v. 92, n. 6, p. 1167-1195, 1992.

61. STOKMAIER, D.; KHOREV, O,; CUTTING, B.; BORN, R.; RICKLIN, D.;. ERNST, T. O. G.; BÖNI, F.; SCHWINGRUBER, K.; GENTNER, M.; WITTWER, M.; SPREAFICO, M.; VEDANI, A.; RABBANI, S.; SCHWARDT, O.; ERNST, B. Design, synthesis and evaluation of monovalent ligands for the asialoglycoprotein receptor (ASGP-R). **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 20, p. 7254-7264, 2009.

62. CARVALHO, I.; SCHEUERL, S. L.; RAVINDRANATHAN-KARTHA, K. P.; FIELD, R. A. Practical synthesis of the 2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy-β-D-glucosides of Fmoc-serine and Fmoc-threonine and their benzyl esters. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 10, p. 1039-1043, 2003.

63. TRAAR, P.; BELAJ, F.; FRANCESCONI, K. A. Synthesis of methyl 2-acetamido-2-deoxy-1-seleno-β-D-gluco- and galacto-pyranoside: selenium metabolites in human urine. **Australian Journal of Chemistry**, v. 57, n. 11, p. 1051-1053, 2004.

64. ELLERVIK, U.; MAGNUSSON, G. Glycosylation with *N*-Troc-protected glycosyl donors. **Carbohydrate Research**, v. 280, n. 2, p. 251-260, 1996.

65. CHANG, C. W.; CHANG, S. S.; CHAO, C. S.; MONG, K. K. T. A mild and general method for preparation of α-glycosyl chlorides. **Tetrahedron Letters**, v. 50, n. 31, p. 4536-4540, 2009.

66. ELOFSSON, M.; WALSEB, B.; KIHLBERG, J. Building blocks for glycopeptide synthesis: glycosylation of 3-mercaptopropionic acid and Fmoc amino acids with unprotected carboxyl groups. **Tetrahedron Letters**, v. 32, n. 51, p. 7613-7616, 1991.

67. WINANS, K. A.; KING, D. S.; RAO, V. R.; BERTOZZI, C.R. A chemically synthesized version of the insect antibacterial glycopeptides, diptericin, disrupts bacterial membrane integrity. **Biochemistry**, v. 38, n. 36, p. 11700-11710, 1999.

68. LIEBE, B.; KUNZ, H. Solid-phase synthesis of a sialyl-Tn-glycoundecapeptide of the MUC1 repeating unit. **Helvetica Chimica Acta**, v. 80, n. 5, p. 1473-1482, 1997.

69. KHATUNTSEVA, E. A.; TSVETKOV, Y. E.; GRACHEV, A. A.; NIFANT'EV, N. E. Synthesis of Aminoethyl Glycosides of Type 2 Chain A Tetrasaccharide and Related Trisaccharides. **Russian Journal of Organic Chemistry**, v. 41, n. 12, p. 1814-1823, 2005.

70. SEIBEL, J.; HILLRINGHAUS, L.; MORARU, R. Microwave-assisted glycosylation for the synthesis of glycopeptides. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 3, p. 507-511, 2005.

71. SZABO, L.; RAMZA, J.; LANGDON, C.; POLT, R. Stereoselective synthesis of O-serinyl/threoninyl-2-acetamido-2-deoxy-α- or β-glycosides. **Carbohydrate Research**, v. 274, p. 11-28, 1995.

72. LEE, B. R.; JEON, J. M.; JUNG, J. H.; JEON, H. B.; KIM, K. S. Synthesis of the tetrasaccharide repeat unit of the O-antigen polysaccharide from Escherichia coli O77 employing the 2'-carboxybenzyl glycoside. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 84, n. 4, p. 506-515, 2006.

73. POZSGAY, V. A Convergent Synthesis of a Hexadecasaccharide Fragment of the O-Polysaccharide of Shigella dysenteriae Type 1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 25, p. 6673-81, 1995.

74. NICHOLAS, G. M.; ECKMAN, L. L.; KOVAC, P.; OTERO-QUINTERO, S.; BEWLEY, C. A. Synthesis of 1-D- and 1-L-myo-inosityl 2-N-acetamido-2-deoxy-□ -D-glucopyranoside establishes substrate specificity of the Mycobacterium tuberculosis enzyme AcGI deacetylase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 12, p. 2641-2647, 2003.

75. RAVINDRANATHAN-KARTHA, K. P.; ALOUI, M.; FIELD, R. A. Iodine: a versatile reagent in carbohydrate chemistry. III. Efficient activation of glycosyl halides in combination with DDQ. **Tetrahedron Letters**, v. 37, n. 48, p. 8807-8810, 1996.

76. HARRISON, J. A.; KARTHA, K. P. R.; TURNBULL, W. B.; SCHEUERL, S. L.; NAISMITH, J. H.; SCHENKMAN, S.; FIELD, R. A. Hydrolase and sialyltransferase activities of Trypanosoma cruzi trans-sialidase towards NeuAc-α-2,3-Gal-β-O-PNP. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, n. 2, p. 141-144, 2001.

77. CARVALHO, I.; ANDRADE, P.; CAMPO, V. L.; GUEDES, P. M. M.; SESTI-COSTA, R. SILVA, J. S.; SCHENKMAN, S. DEDOLA, S.; HILL, L.; REJZEK, M.; NEPOGODIEV, S. A.; FIELD, R. A. 'Click chemistry' synthesis of a library of 1,2,3-triazole-substituted galactose derivatives and their evaluation against Trypanosoma cruzi and its cell surface trans-sialidase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 7, p. 2412-2427.

78. NERES, J.; BONNET, P.; EDWARDS, P. N.; KOTIAN, P. L; BUSCHIAZZO, A.; ALZARI, P. M.; BRYCE, R. A. DOUGLAS, K. T. Benzoic acid and pyridine derivatives as inhibitors of Trypanosoma cruzi trans-sialidase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry,** v. 15, n. 5, p. 2106-2119, 2007.

79. YAMADA, K.; WATANABE, S.; KITA, S.; KINOSHITA, M.; HAYAKAWA, T.; KAKEHI, K. Determination of Tn antigen released from cultured cancer cells by capillary electrophoresis. **Analytical Biochemistry,** v. 396, p. 161-163, 2010.