Caracterización proteómica de antígenos compartidos entre Cáncer y *T. cruzi*

Tesina de fin de Carrera- Licenciatura en Bioquímica

Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Claudia Schvartzman Di Segni

Tutor: Dr. Eduardo Osinaga

Laboratorio de Glicobiología e Inmunobiología tumoral

Institut Pasteur de Montevideo

Resumen

Datos epidemiológicos han revelado una relación inversa entre la incidencia de algunas infecciones parasitarias y el desarrollo de cáncer. Se ha reportado además que la inmunización con extractos proteicos del parásito *Trypanosoma cruzi* previene la aparición de tumores en un 60% de ratones inyectados con la línea tumoral murina derivada de carcinoma de pulmón, LL/2.

Considerando estos hallazgos, se postula la existencia de reacciones inmunológicas cruzadas donde el desarrollo de una enfermedad puede afectar el curso de la otra. Sin embargo, las bases moleculares de este proceso son aún desconocidas. En este contexto, el objetivo del presente trabajo se centra en profundizar la caracterización de antígenos compartidos entre el parásito *T. cruzi* y la línea de pulmón murino LL/2. Para ello se desarrollaron anticuerpos policlonales contra *T. cruzi*, los cuales mostraron reactividad con extractos proteicos tumorales. La identificación de las proteínas reconocidas por dichos anticuerpos se realizó mediante análisis proteómico en geles bidimensionales, en conjunto con Western Blots mono y bidimensionales.

Mediante espectrometría de masa, se identificaron 9 proteínas de LL/2 sujetas a reactividad cruzada no presentes en tejido de pulmón normal. De éstas, 8 proteínas, de las que se destacan Bip, Pin-1, Cofilin-1 y HnrpA2/B1, están asociadas con la transformación maligna y han sido descritas como posibles blancos moleculares para terapia o como marcadores de estadio clínico.

Adicionalmente se optimizaron técnicas para la purificación de estos antígenos tumorales sujetos a reactividad cruzada, lo que permitirá la confirmación de la identidad de los mismos y continuar la caracterización molecular de dichas proteínas.

En conjunto, la identificación de los antígenos tumorales aquí descritos podría contribuir al desarrollo de nuevos métodos de diagnostico así como profundizar en el conocimiento de interacciones inmunológicas entre cáncer y parásitos y en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

Contenido

Resumen **2**

Contenido **3**

Introducción **5**

Cáncer 5

Biología del cáncer 5

Antígenos tumorales 8

Mecanismos efectores de la inmunidad anti-tumoral 13

Mecanismos de escape Tumoral 14

Inmunoterapia anti-tumoral 16

Proteómica y cáncer 18

Similitudes Cáncer-Parásitos 20

Objetivos **27**

Materiales y Métodos **28**

Líneas celulares 28

Preparación de extractos celulares de LL/2 28

Preparación de extracto de Trypanosoma cruzi 29

Cuantificación de proteínas 29

Producción de anticuerpos policlonales anti-*Trypanosoma cruzi* 30

Purificación de anticuerpos policlonales anti- *T.cruzi* 30

Purificación de IgGs por cromatografía de afinidad con proteína A 30

Purificación de antígenos tumorales 32

SDS-PAGE 34

Western Blot 34

Espectrometría de masa 37

Resultados **38**

Producción de anticuerpos policlonales anti-*T. cruzi.* 38

Purificación de IgGs por cromatografía de afinidad con Proteína A-agarosa 39

Purificación de IgGs anti-T. cruzi por cromatografía de afinidad con sefarosa activada con CNBr. 40

Reactividad cruzada LL/2 *T-cruzi.* 42

Western Blot monodimensional 42
Western Blot bidimensional 44
Purificación de antígenos tumorales 49
Discusión 51
Conclusiones 58
Referencias Bibliográficas 59

Introducción

Cáncer

Biología del cáncer

Durante el desarrollo normal y a lo largo de la vida adulta, intricados sistemas de regulación génica, regulan el balance entre renovación celular y muerte, el cual determina el tamaño corporal adulto y la tasa de crecimiento en alcanzar ese tamaño. En algunos tejidos , la proliferación celular ocurre como una estrategia de continuo recambio (Lodish 2003). Sin embargo, ocasionalmente se generan células que no responden a los mecanismos de control del crecimiento celular, dando origen a clones que pueden expandirse y generar lo que se denomina tumor o neoplasma (Goldsby *et al*, 2003).

Un tumor que no es capaz de crecer indefinidamente, y por tanto no invade tejidos sanos se denomina benigno. Sin embargo, aquellos tumores que continúan creciendo y se convierten progresivamente en invasivos son malignos, siendo el término cáncer utilizado específicamente para este último tipo de tumores (Goldsby *et al*, 2003). Los tumores malignos pueden generar metástasis, donde pequeños grupos de células malignas se separan del tumor, invaden la sangre o vasos linfáticos y son transportados así a otros tejidos donde continúan proliferando. De esta manera un tumor primario puede originar un tumor secundario en otro tejido (Goldsby *et al*, 2003).

La mayoría de los tumores se forman por alteración en los genes tanto por factores ambientales como carcinógenos, radiación UV, virus, o por factores intrínsecos tales como errores en el copiado o reparación de genes o determinados por herencia de una dotación génica determinada. Sin embargo, raramente una única mutación lleva al comienzo de un tumor, típicamente, una serie de mutaciones en múltiples genes genera progresivamente tipos celulares que proliferan más rápidamente y que escapan a las restricciones de crecimiento. Eventualmente, uno de estos clones puede crecer y multiplicarse para formar un tumor, pudiéndose considerar entonces que originalmente los tumores tienen un origen monoclonal (Lodish *et al,* 2003).

La pérdida de regulación en el ciclo celular está relacionado con mutaciones en cuatro grupos de genes implicados en el inicio de cáncer: proto-oncogenes, genes

supresores de tumores, los genes que regulan la apoptosis y los genes reparadores del ADN (Lodish *et al,* 2003, Kumar *et al*, 2007)

Un oncogén es cualquier gen que codifique una proteína capaz de transformar células de tejido sanas a tumorales. Generalmente estos genes codifican para moléculas de señalización de promoción del crecimiento y sus receptores, factores de transcripción o proteínas de supervivencia. La conversión o activación de un proto-oncogén en un oncogén generalmente requiere una mutación de ganancia de función (Lodish *et al,* 2003).

Por otra parte, los genes supresores de tumores generalmente codifican para proteínas que inhiben la proliferación celular y por tanto, mutaciones que generen la pérdida de función contribuye al desarrollo del cáncer. Entre estos genes se encuentran proteínas intracelulares que regulan o inhiben la progresión de etapas específicas del ciclo celular, receptores o transductores de señales de hormonas secretadas o señales de desarrollo que inhiben la proliferación celular (Lodish *et al,* 2003).

En adición, las células tumorales pueden adquirir resistencia a la muerte celular programada, interfiriendo a diferentes niveles en la señalización de la apoptosis. Entre los mecanismos descritos se encuentra la expresión aumentada de genes anti-apoptóticos, la disminución en expresión o mutación en genes de moléculas pro-apoptóticas, así como modificaciones en la vía de inducción de apoptosis. Pudiéndose clasificar adicionalmente estos genes como protoncogenes o genes supresores de tumores respectivamente (Igney *et al* 2002, Lodish *et al,* 2003).

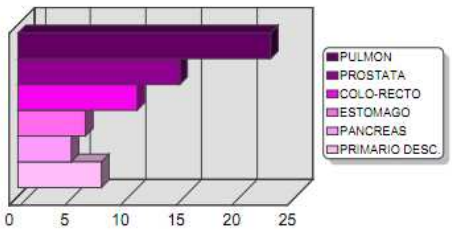
Finalmente, mutaciones en genes involucrados en la reparación del ADN puede promover la acumulación de cambios en los genes antes mencionados, potenciando la adquisición de un fenotipo tumoral maligno (Berwick , 2000).

Considerando las modificaciones que se presentan en estos genes, se ha sugerido que en células tumorales se manifiestan seis alteraciones esenciales en la fisiología celular que, colectivamente, dictan el crecimiento maligno. La autosuficiencia de señales de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento celular, evasión de muerte celular programada por apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis que vascularia el tumor y finalmente evasión tisular y metástasis. Asimismo, el orden en que los tumores adquieren estas características pueden ser variables dependiendo del tejido afectado (Hanahan, 2000).

Más de cien tipos de cáncer y subtipos de tumores pueden ser encontrados en órganos específicos (Hanahan, 2000). Las células animales normales son clasificadas generalmente de acuerdo al tejido embrionario del cual se originan, consecuentemente, los distintos tipos tumorales son clasificados de forma análoga. De esta forma, tumores malignos son clasificados como carcinomas si derivan del endodermo (epitelios intestinales) o ectodermo (piel y neuroepitelio), y como sarcomas si derivan del mesodermo (precursores de sangre, músculo y tejido conectivo) (Lodish *et al,* 2003). Adicionalmente, las leucemias, se originan a partir de células provenientes del sistema hematopoyético; los linfomas desarrollados en células de las glándulas del sistema inmune; por último los mielomas desarrollados a partir de células plasmáticas de médula ósea.

En el Uruguay, el cáncer es la segunda causa de muerte, situándose por debajo de enfermedades cardiovasculares. (Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer, 2008). La incidencia de esta patología es coincidente con países del primer mundo, donde el aumento en las expectativas de vida es proporcional a la incidencia de enfermedades degenerativas como el cáncer (DePinho, 2000). Particularmente, el cáncer de pulmón es el que presenta mayor mortalidad en hombres y es la tercer causa en mujeres según estudios de la comisión Honoraria de Lucha Contra el cáncer entre los años 2004-2008 y se detalla en la figura 1.

Hombres		%
1	PULMON	22.68
2	PROSTATA	14.53
3	COLO-RECTO	10.69
4	ESTOMAGO	6.05
5	PANCREAS	4.78
	PRIMARIO DESC.	7.49



Mujeres		%
1	MAMA	19.67
2	COLO-RECTO	14.23
3	PULMON	6.35
4	PANCREAS	6.55
5	CUELLO UTERINO	4.14
	PRIMARIO DESC.	9.37

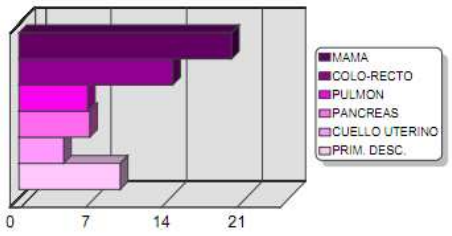


Figura 1. Distribución porcentual de la mortalidad, localizaciones más frecuentes en el Uruguay en el período comprendido entre 2004-2008 Adaptado de comisión honoraria de lucha contra el cáncer (2008)

Antígenos tumorales

La inestabilidad genética a consecuencia de mutaciones en el genoma permite que nuevos antígenos sean expresados en células tumorales a medida que se desarrolla y progresa el proceso de carcinogénesis. Si bien la sobre expresión de genes presentes en células tumorales no genera nuevos antígenos, el aumento en la concentración de los mismos puede afectar su antigenicidad (Drake, *et al* 2006).

De esta forma, dos tipos de antígenos tumorales han sido descritos; los antígenos específicos de tumor y los antígenos asociados a tumor (Goldsby *et al*, 2003). Los antígenos específicos de tumor son característicos de células tumorales, los que se generan a partir de proteínas alteradas. Por otra parte, los antígenos asociados a tumor, no son únicos de células tumorales, pudiendo ser proteínas expresadas en células normales, pero que normalmente no están presentes en el adulto o presentan un aumento en la expresión respecto a células no tumorales (Goldsby *et al*, 2003).

Los antígenos específicos de tumor han sido caracterizados en tumores inducidos con carcinógenos físicos o químicos así como por inducción con virus. La presencia de los mismos en tumores que se generan espontáneamente es particularmente difícil, puesto que el sistema inmune elimina células que presenten una alta concentración de estos antígenos de superficie (Goldsby *et al,* 2003).

Por otra parte, la mayoría de los antígenos tumorales son antígenos asociados a tumor, compuestos por proteínas que pueden estar presentes en células normales. Se han definido cinco clases de antígenos con estas características, que comprenden antígenos sobre-expresados, específicos de linaje o diferenciación, antígenos virales, autoantígenos mutados ó alterados, antígenos cancerosos y testiculares los que se detallan en la tabla 1 (Linley , *et al* 2011; Stevanovic 2002; William 2008).

Tabla 1. Clasificación de antígenos asociados a tumor. adaptado de William 2008)

Tipo de antígeno	Nombre	Localización
Sobre expresados	FGF-5	Renal
	HER-2	Mama
	MUC-1	Mama/ovario/linfoma
	WT-1	Leucemia
	PRAME	Melanoma
Específicos de linaje/ diferenciación	gp100	Melanoma
	Melon-A/MART-1	Melanoma
	Tirosinasa	Melanoma
	PSA	Próstata
Virales	E6/E7	Cervical, cabeza y cuello
	EBNA	Linfoma
	Tax	Leucemia cél T./Linfoma
	HCV core	Hepatocelular
Autoantígenos mutados/ Alterados	CDK4	Meanoma
	HLA-A*	Melanoma
Ag Testiculares	MAGE	Melanoma
	HAGE	Leucemia/mieloma/ Linfoma
	PRAME	Leucemia/mieloma
	NYESO-1	Varios

Se ha observado que determinados tumores son capaces de estimular la sobre-expresión de ciertos constituyentes celulares que a su vez promueven el crecimiento maligno. Ejemplos de estos antígenos sobre-expresados incluyen el antígeno HER-2 y MUC-1 en carcinoma de mama y el antígeno Wilm´s Tumour-1 (WT-1) en varios tipos de transformaciones malignas como ser cáncer de pulmón, de ovario, gástrico y hematológicos incluyendo leucemias y linfomas (Linley *et al*, 2011, William, 2008).

Los Antígenos específicos de Linaje y/ó Diferenciación están restringidos a determinados tipos tisulares y luego de una transformación oncogénica son sobre-expresados. Este grupo de antígenos asociados a tumor han sido descritos ampliamente en melanoma dentro de los que se encuentran tirosina-quinasas gp75, gp100 y melan-A/MART-1 (Linley *et al*, 2011).

Por otra parte, los antígenos inducidos por virus, son compartidos por todos los tumores que fueron inducidos por el mismo virus. Ciertos virus poseen en su genoma genes que son capaces de inducir la transformación una vez que se han integrado al genoma del huésped. En el linfoma de Burkitt, se demostrado que las células expresan un antígeno nuclear del virus Epstein-Barr, asimismo, en papiloma virus humano (HPV), las proteínas E6 y E7 se encuentran en más del 80% de cánceres invasivos cervicales (Goldsby *et al,* 2003).

Adicionalmente, la acción de carcinógenos puede generar cambios genéticos que potencialmente resulten en oncogénesis, cambiando los genes afectados en varias formas y generándose así antígenos propios modificados o mutados. Ejemplos de estos incluyen al gen que codifica para la proteína Ras. Mutaciones puntuales en su secuencia pueden originar una proteína incapaz de ser inactivada ó resistente a la inactivación. Esta alteración se encuentra en 30% de los cánceres humanos (Linley *et al,* 2011).

Los genes de antígenos testiculares fueron clasificados de esta forma porque se encuentran en células tumorales así como en placenta y tejidos testiculares, sin embargo no lo están en el resto del organismo. Tienen además la particularidad que éstas células no expresan moléculas de HLA por lo que no son reconocidas por células T (William, 2008). Se conocen más de 100 antígenos testiculares que incluyen MAGE, BAGE, GAGE, SSX, NY-ESO-1, HAGE y PRAME entre otros (Linley *et al*, 2011).

Inmunidad y Cáncer

A inicios del siglo XX, Paul Ehrlich predijo la participación del sistema inmunitario en la represión del crecimiento de tumores, los cuales de otra manera, aparecerían con una mayor frecuencia.(Strebhardt *et al* 2008). En la segunda mitad del siglo XX, MacFarlane Burnet y Lewis retoman la idea de Paul Ehrlich y proponen que el sistema inmune identifica células cancerosas o precancerosas y las elimina antes de que se vuelvan malignas en el proceso denominado inmunovigilancia. Sin embargo, varios estudios mostraron que no existía dicha correlación en todos los casos, de hecho, pacientes inmunodeficientes exhiben solo un pequeño aumento en la tasa de tumores sólidos con la excepción de casos raros como el sarcoma de Kaposi, el cual fue observado en pacientes con HIV (Dunn *et al, 2004a)*. Estudios recientes en ratones sugirieron

además evidencia de que el sistema inmune puede prevenir la aparición de cáncer en tumores que presentan antígenos altamente inmunogénicos mientras que, los tumores que poseen mecanismos que previenen la respuesta inmune apropiadamente pueden crecer progresivamente, un mecanismo que se denominó inmuno-edición (Dunn *et al* 2004a). Este concepto amplía el de inmunovigillancia contemplando la observación que el sistema inmune puede tanto proteger al huésped contra el desarrollo tumoral así como promover su crecimiento (Schreiber *et al*, 2011). Factores que influencian el crecimiento tumoral incluyen la inmunogenicidad de los antígenos expresados así como la sensibilidad de los factores del huésped que regulan las respuestas inmunes (William, 2008). El concepto de inmunoedición está dividido en 3 fases designadas eliminación, equilibrio y escape (3E) (Dunn *et al* 2004b) esquematizados en la figura 2. La fase de eliminación corresponde al proceso descrito para inmunovigilancia, donde el sistema inmune detecta y elimina células tumorales. En el caso de que la eliminación sea parcial, la teoría de inmunoedición establece que hay un estado de equilibrio temporal entre el sistema inmune y el tumor en desarrollo. Durante este período, algunas células tumorales pueden permanecer quiescentes o continuar acumulando cambios (como mutaciones del ADN o en la expresión génica) y así modular la expresión de antígenos específicos de tumor o antígenos inducidos por estrés. A medida que este proceso continúa, el sistema inmune ejerce presión selectiva, eliminando los clones tumorales susceptibles. La presión generada durante esta fase es suficiente para controlar la progresión tumoral. Eventualmente, si no se eliminan las células tumorales completamente, el proceso resulta en selección de variantes tumorales capaces de resistir, evadir o suprimir el sistema inmune. El resultado de este proceso pasivo está determinado por múltiples factores en el ambiente tumoral tales como factores de crecimiento, acceso a nutrientes y la presión inmune. En todos los casos, el sistema inmune juega un rol en delinear las características fenotípicas de tumores generados espontáneamente, llevando a la fase de escape. Durante ésta, el sistema inmune ya no es capaz de contener el crecimiento tumoral y resulta en un crecimiento progresivo del tumor. Adicionalmente, inmunoterapias que llevan a una eliminación parcial del tumor representa un escenario adicional donde la presión selectiva puede generar el escape de variantes preexistentes del tumor (William 2008, Dunn *et al* 2004a,b, Swann ,2007).

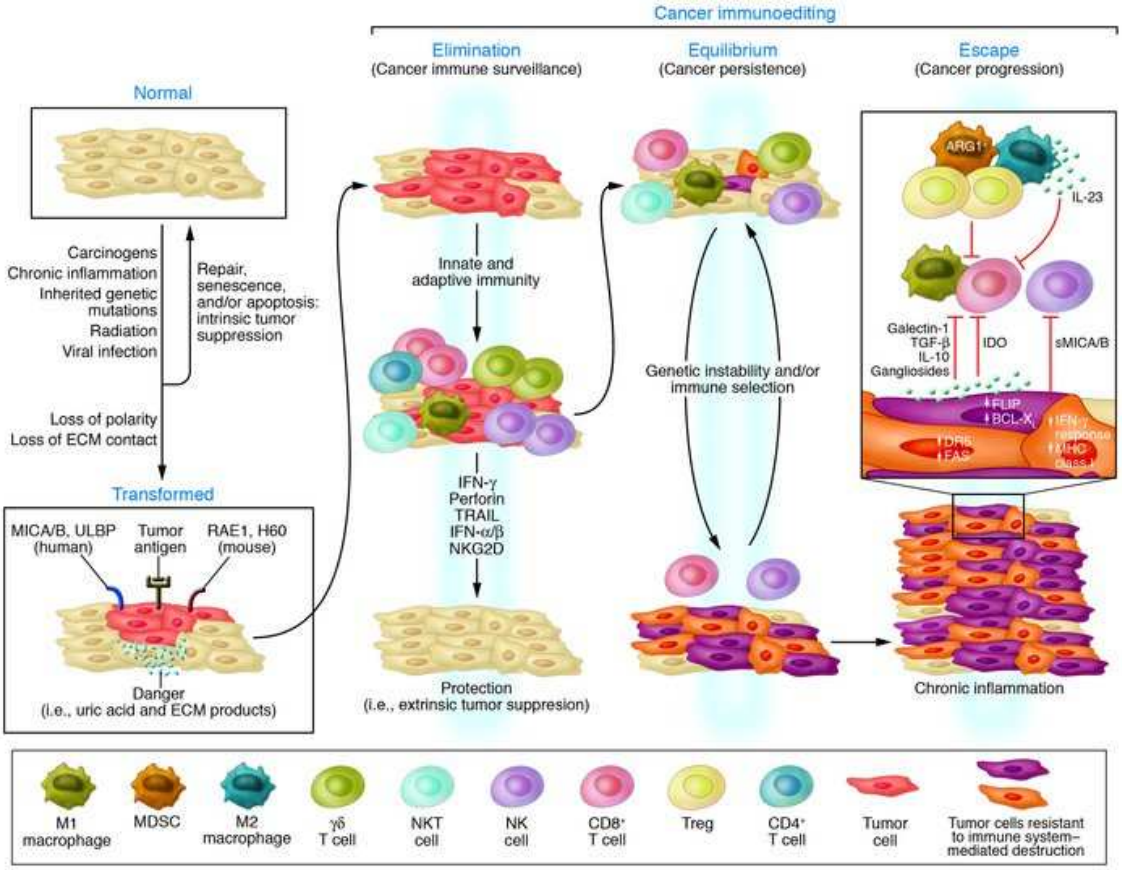


Figura 2 Inmunoedición del cáncer Las células normales están expuestas a estímulos oncogénicos que pueden conducir a la transformación maligna. El proceso de inmunoedición del cáncer está compuesto por 3 fases, eliminación o inmunovigilancia, en el cual las células tumorales exponen señales que pueden mediar su eliminación por el sistema inmune antes de ser clínicamente aparentes. La segunda fase de equilibrio, donde las células tumorales y el sistema inmune están en equilibrio dinámico, y escape, donde las células tumorales que tienen tanto inmunogenicidad reducida o mecanismos inmunosupresores para atenuar respuestas. Adaptado de Swann 2007.

.

Mecanismos efectores de la inmunidad anti-tumoral

Como se mencionó anteriormente, en la fase de eliminación las células tumorales son efectivamente reconocidas y eliminadas por el sistema inmune.

Señales de daño o estrés generadas en el microambiente tumoral podrían contribuir al establecimiento de una reacción pro-inflamatoria que promovería el desencadenamiento de una respuesta inmunitaria (Schreiber *et al*, 2011). En particular, la producción de ácido úrico como subproducto del metabolismo tumoral, la liberación de proteínas de choque térmico (HSPs) y la presencia de productos de degradación de la matriz extracelular, tales como el ácido hialurónico o heparán sulfatos pueden mediar estas señales (Schreiber *et al,* 2011). Por otra parte, ligandos asociados a estrés como ser RAE-1 y H60 ó MICA/B actúan como señales de activación de células efectoras. El reconocimiento de dichas señales por los receptores apropiados en células del sistema inmunológico innato lleva a la liberación de citoquinas que promueven posteriormente el desarrollo de una respuesta adaptativa específica para el tumor (Schreiber et al, 2011).

Diversos mecanismos efectores del sistema Inmunológico se han asociado a la eliminación de células tumorales. Una de las células efectoras implicadas son las células Natural Killer (NK), cuya actividad está regulada por un balance entre señales provenientes de receptores activadores como NKG2D que reconocen motivos alterados en la superficie celular como MICA/MICB y receptores inhibitorios que reconocen moléculas de expresión normal en las células, como motivos conservados en las moléculas MHC de clase I (William 2008, Goldsby, *et al* 2003). La activación de las células NK lleva a la inducción de apoptosis de las células blanco mediante la liberación de gránulos conteniendo moléculas de perforina y de granzima, o mediante interacciones entre receptores de membrana como Fas/Fas-L (Murphy 2008) . Por otra parte, las células NK pueden desencadenar sus mecanismos efectores ante el reconocimiento de anticuerpos IgG unidos a la superficie de las células tumorales, mecanismo denominado citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) (Murphy *et al* , 2008).

Los linfocitos T CD8+ citotóxicos también participan en la eliminación de células transformadas, a través del receptor TCR en complejo con moléculas MHC de clase I que presenten antígenos tumorales específicos. Los mecanismos empleados por estos son esencialmente los mismos que los desencadenados por las células NK. Sin embargo, los linfocitos T CD8+ requieren de una activación previa por células presentadoras de

antígeno y colaboración por linfocitos T CD4+ (Murphy *et al*, 2008). Por tanto, poblaciones celulares como las células presentadoras de antígeno y los T CD4+ son esenciales para estimular la generación de tales respuestas. Adicionalmente, la liberación local de citoquinas pro-inflamatorias como el IFN-α, tanto por células de la inmunidad innata como de la adaptativa, contribuirían a la activación de células efectoras de la inmunidad y al reclutamiento de poblaciones celulares adicionales en la vecindad del tumor (Weinberg, 2007).

Mecanismos de escape Tumoral

En la fase de escape, las células tumorales que han adquirido la habilidad de evadir el reconocimiento o los mecanismos efectores del sistema inmune emergen progresivamente. La transición desde la fase de equilibrio a la de escape puede ocurrir, porque las poblaciones de células tumorales cambian su respuesta al sistema inmune o porque el sistema inmune cambia en respuesta a un ambiente inmunosupresor generado por el tumor o un deterioro del sistema inmune (Schreiber et al, 2011). El reconocimiento de antígenos por las células dendríticas en estas condiciones no genera su activación y maduración. Adicionalmente, así como otras células tisulares, las células tumorales no expresan moléculas de co-estimulación por tanto, el reconocimiento de antígenos tumorales por linfocitos T CD8+ y T CD4+ puede generar anergia en los mismos (William, 2008)

Entre los mecanismos de evasión tumoral se destaca la alteración en el reconocimiento inmune, el cual puede generarse mediante una reducción o modificación en la expresión de antígenos tumorales. A su vez, la disminución en la expresión de proteínas de presentación antigénica como el complejo mayor de histocompatibilidad MHC de clase I evade el reconocimiento de estas células por parte de linfocitos T (Schreiber et al, 2011, Drake *et al* 2006). Adicionalmente, modificaciones en el procesamiento de antígenos en células tumorales también ha sido descrito como mecanismo de evasión inmune. Sin embargo, estas células tumorales son susceptibles a células NK las que expresan los receptores de independientes de la presentación por MHC de clase I (William 2008).

Por otra parte, un aumento en la resistencia a los efectos citotóxicos del sistema inmune permite también el escape tumoral, mediado por la activación de mecanismos

anti-apoptóticos, como pueden ser el factor de transcripción STAT3 o expresión de moléculas antiapoptóticas efectoras como BCL-2. Asimismo, una disminución en la expresión de Fas en los tumores también podría contribuir a la resistencia a apoptosis (Dunn *et al* 2002, Schreiber *et al* 2011).

La mayoría de los tumores parecen crecer en un microambiente anti-inflamatorio que no genera activación inmune (William 2008). Células tumorales pueden generar este estado produciendo citoquinas inmunosupresoras, depleción de metabolitos, expresión de moléculas co-estimuladoras con propiedades inhibitorias o el reclutamiento de células reguladoras (Rabinovich *et al* 2007).

Dentro los factores inmunosupresores cabe destacar el factor de crecimiento vascular endotelial, VEGF (vascular endotelial growth factor) producida por una variedad de tumores, inhibe la diferenciación y maduración de células dendríticas (Gabrilovich *et al* 1998). Adicionalmente, la expresión de TGF-β (Transforming Growth Factor β) inhibe la activación, proliferación y diferenciación de linfocitos T, la citoquina IL-10 por su parte, inhibe la maduración de células dendríticas y puede proteger a las células tumorales de linfocitos citotóxicos disminuyendo la expresión de HLA de clase I y de clase II . (Rabinovich *et al* 2007). Por otra parte, la enzima indoleamine 2,3 dioxygenasa (IDO) la cual es expresada en células dendríticas tolerogénicas, así como numerosos tumores, inhibe la respuesta a linfocitos T a través del catabolismo del triptófano, depletando el medio de este aminoácido esencial para linfocitos T (Drake *et al 2006*).

Muchos tumores se caracterizan por reclutar células regulatorias que funcionan como efectores de inmunosupresión. La población de linfocitos T reguladores se encuentra aumentada en individuos con cáncer (Weinberg, 2007), produciendo citoquinas inmunosupresoras como TGF-β o IL-10. Adicionalmente, expresan moléculas de co-estimulación negativas como CTLA-4, PD1 y PD-L1 y son capaces de consumir IL-2 (Schreiber *et al*, 2011). Por otra parte las células mieloides supresoras MDSCs, inducen células Tregs, producen TGF-β, depletan o secuestran aminoácidos esenciales para la linfocitos T por lo que contribuyen a generar un ambiente inmunosupresor tumoral (Schreiber *et al*, 2011).

Inmunoterapia anti-tumoral

El tratamiento actual contra el cáncer consiste en la administración de determinados fármacos como agentes quimioterapéuticos y la administración de dosis controladas de radioterapia (Sharkey, *et al* 2006).

Asimismo, el uso de estrategias inmunoterapéuticas está comenzando a utilizarse como complemento de quimioterapia y radioterapia. Una estrategia es utilizar como blanco terapéutico los antígenos asociados a tumor, para potenciar la respuesta inmune contra células tumorales, evitando así los procesos de equilibrio y escape planteados en el modelo de inmunovigilancia (Sharkey *et al,* 2006).

La administración de anticuerpos en terapia contra el cáncer, busca inducir destrucción directa o indirecta de células tumorales, marcando específicamente el tumor mediante antígenos de superficie específicos o la vasculatura que lo nutre mediante el uso de anticuerpos monoclonales. Un anticuerpo monoclonal es aquel que reconoce específicamente un epítope concreto, y es producido por un clon de linfocitos B (Ruiz *et al* 2006). Dentro de éstos se han desarrollado anticuerpos monoclonales murinos, los que tienen efectos terapéuticos limitados dada su alta inmunogenicidad denominada respuesta HAMA (Human Antimouse Monoclonal Antibody) y su pobre capacidad para desarrollar una respuesta efectora a través de su región constante mediante ADCC. Los anticuerpos quiméricos por otra parte, están conformados por las regiones variables murinas y las regiones constantes humanas, construidos mediante ingeniería genética, evadiendo así la respuesta HAMA. Adicionalmente, se han desarrollado anticuerpos monoclonales humanizados donde solamente las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las cadenas variables de los anticuerpos son murinos y el resto de origen humano. Finalmente, los anticuerpos humanos, son en su totalidad de origen humano reduciendo así el riesgo de producir una respuesta inmune (Brekke , 2003).

Dentro de los blancos más comunes de anticuerpos monoclonales desarrollados aprobados para terapia, se encuentran el antígeno carcinoembrionario (CEA), el cual está asociado a cáncer colorectal, MUC1 en cáncer de pulmón y mama, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en cáncer de pulmón y mama, así como CD20 en células B para linfomas no-Hodking´s (Brekke *et al*, 2003).

La proteína Her-2/neu está implicada en la señalización a través de un receptor para un factor de crecimiento, y por tanto la función de la misma podría jugar un papel

importante en la terapia mediada por este anticuerpo ya que se encuentra sobre-expresada en un cuarto de pacientes con cáncer de mama (Hudelist *et al*, 2003). El anticuerpo humanizado IgG1 Trastuzumab fue desarrollado con blanco en esta proteína y se encuentra aprobado para su uso en los tratamientos anti-tumorales. Asimismo, se generaron anticuerpos marcados con 111In and Ga68, para utilizar en imagenología para pacientes con cáncer de mama mediante SPECT Y PET (Romero *et al,* 2011).

Por otra parte, el anticuerpo Rituximab el cual está dirigido contra la proteína de superficie CD20 de linfocitos B, también ha mostrado efectos terapéuticos para leucemias contra células B (Held *et al,* 2006).. No es claro como son mediados los efectos del anticuerpo no conjugado pero podría implicar la inducción de apoptosis, ADCC así como CDC. Pruebas adicionales han evaluado el uso de Rituximab conjugado a radio nucleídos para tratamiento de cáncer. (Lay *et al,* 2006).

La conjugación de toxinas con anticuerpos monoclonales es una estrategia prometedora ya que busca dirigir la terapia exclusivamente a las células tumorales (Kreitman, 2006). Otro tipo de estrategias apuntan hacia el desarrollo de fragmentos de anticuerpos monoclonales conjugados con isotopos radiactivos. Estos fragmentos conjugados muestran menor tiempo de permanencia en sangre y por tanto evitan la continua exposición al radioisótopo del resto del organismo. Finalmente, otra estrategia en desarrollo consiste en la generación de anticuerpos biespecíficos que en ensayos clínicos han mostrado mayores rendimientos que los anticuerpos conjugados (Romer *et al* 2011).

Otra estrategia terapéutica en desarrollo se basa en la gran capacidad de las células dendríticas en activar los linfocitos T para dirigir la respuesta inmune (Gilboa *et al* 1998) como estrategia de vacunación no convencional. El uso de las células dendríticas cargadas con antígenos que presentan motivos comunes a antígenos asociados a tumor en la inmunoterapia contra cáncer, ha sido puesto a punto en modelo (Tuma *et al* 2011, Tacken *et al*, 2007). En este tipo de estrategia experimental las células dendríticas autólogas son cargadas ex vivo con antígenos tumorales y son administradas al paciente. Las mismas migran al ganglio donde presentan y activan a las células T. Cabe destacar que esta estrategia excluye a las células dendríticas de posibles señales inmuno-supresoras que puedan existir en el microambiente tumoral (Tacken *et al* 2007). Una alternativa a esta estrategia es el cargado *in vivo* de la célula dendrítica, estrategia

denominada "in vivo DC targeting". De esta manera, se inmuniza a los animales con los antígenos tumorales de interés fusionados a moléculas con conocida capacidad de unirse y ser internalizadas por las células dendríticas por medio de sus receptores de superficie como ser los anticuerpos anti-FCgR ó anti DEC205 (Bonifaz *et al,* 2004, Proudfoot *et al,* 2007).

Cabe destacar que en las estrategias terapéuticas antes descritas, la identificación de antígenos tumorales es esencial para generar una potenciación del sistema inmunológico contra las células tumorales, demostrando la importancia en la identificación y estudio de dichos antígenos.

Proteómica y cáncer

Las estrategias experimentales denominadas ómicas han contribuido al estudio y entendimiento de los procesos tumorales antes descritos. Tienen como objetivo la detección global de genes en la genómica, del ARN mensajero en la transcriptómica, la detección de proteínas en proteómica y metabolitos en la metabolómica de muestras biológicas ya sea a nivel celular, tisular, o de todo un organismo. Asimismo, la información que se genera con este tipo de análisis es compleja y requiere un cuidadoso análisis de datos, siendo necesario el uso de herramientas bioinformáticas como estadísticas (Horgan *et al,* 2011).

El presente trabajo se centrará en técnicas proteómicas, las cuales refieren al estudio de la totalidad de proteínas en una muestra en cuanto a su identidad, propiedades bioquímicas o roles funcionales, así como cantidad y modificaciones estructurales que ocurren durante el desarrollo o en respuesta a estímulos internos o externos (National Cancer Institute, 2009). La relevancia de este enfoque radica en que el proteoma de un organismo es más complejo que su genoma. Varios genes tienen el potencial de producir más de una versión de una proteína dada, mientras que, adicionalmente, las proteínas pueden sufrir modificaciones post-traduccionales aumentando así la complejidad y modificando sus propiedades y funciones. De hecho, la composición proteica de un organismo o tejido cambia constantemente a medida que varía la expresión proteica, la que puede estar mediada por estímulos externos o internos, en contraste con el genoma de un individuo que se mantiene relativamente constante durante el curso de su vida

(National Cancer Institute, 2009). Las principales técnicas empleadas en proteómica son los microarrays de proteínas, electroforesis bidimensional y espectrometría de masa (Conrad *et al,* 2007).

Los microarrays de proteínas usan múltiples anticuerpos de captura diferentes fijados de forma separada a una placa o múltiples muestras de tejido y proteínas fijadas en un único soporte. Si bien estos métodos pueden detectar la presencia de numerosas proteínas o el nivel de expresión en múltiples muestras de tejido respectivamente, esta técnica es limitada por la disponibilidad de anticuerpos específicos y sensibles. De hecho, la especificidad de los anticuerpos debe ser validada por inmunoblot y controles internos son requeridos (Conrad *et al*, 2007).

Las técnicas más comúnmente utilizadas en proteómica implican la separación de proteínas por electroforesis bidimensional (2DE), en la cual, se realiza una primera separación por enfoque isoeléctrico, separando las proteínas basados en su carga, seguida de una segunda dimensión en la cual, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) las proteínas se separan de acuerdo a su masa molecular. De esta forma, pueden obtenerse patrones de cientos de proteínas individuales en un mismo gel, y sus perfiles ser comparados en diversas condiciones biológicas. Esta técnica es descriptiva, por lo que puede ser acoplada a técnicas analíticas como lo es la espectrometría de masa, para la caracterización de dichas proteínas (Smith *et al*, 2006).

La espectrometría de masa provee información estructural como la masa de péptidos y la secuencia de aminoácidos de una muestra la cual es utilizada luego para identificar a la proteína mediante búsqueda en base de datos. Para ello, es necesario la extracción y digestión de las proteínas desde los geles bidimensionales, utilizando proteasas específicas como tripsina para luego ser analizados en espectrómetros de masa los que son capaces de formar, separar y detectar iones moleculares en la base del cociente entre masa y carga (m/z) (Smith *et al,* 2006).

El estudio de cáncer mediante proteómica se centra en tres temas principales, la definición de categorías para los distintos subtipos de tumores que puedan mejorar la clasificación de los mismos su diagnóstico, la identificación de proteínas que puedan servir como blancos moleculares para mejorar el diagnóstico y/o terapia y la asociación de los perfiles de expresión génica y de proteínas en la prognosis de la enfermedad.

El uso de geles bidimensionales y espectrometría de masa comparando el patrón de expresión proteica entre muestras de tejidos sanos y tumorales ha sido utilizada para la identificación de marcadores en varios tipos de cáncer como hígado, pulmón, próstata y mama entre otros. Adicionalmente, el desarrollo de técnicas que permiten la obtención de muestras de tejidos como la microdisección por laser ha facilitado la búsqueda de marcadores de fase temprana. (Wulfkuhle *et al*, 2003). A modo de ejemplo, en un trabajo para la identificación de potenciales biomarcadores en lesiones tempranas de cáncer de mama, muestras obtenidas mediante esta técnica, fueron comparadas en su perfil proteico y los resultados validados por inmunohistoquímica permitieron la identificación de la proteína HSP27, una chaperona molecular así como transgelina, ambas documentadas por su sobre-expresión en cáncer de mama temprano (Wulfkuhle *et al,* 2003).

Antecedentes

Similitudes Cáncer-Parásitos

Si bien el cáncer y las enfermedades causadas por infecciones parasitarias contrastan en los grupos de personas que afectan y su incidencia depende generalmente de las condiciones en la calidad de vida, que generalmente radican en factores socioeconómicos, éstos presentan características similares tanto en los mecanismos biológicos que desarrollan en el huésped como a nivel de estructuras antigénicas.

En particular, ambos se caracterizan por poseer un fenotipo invasor, el que les permite pasar de un huésped a otro en el caso de los parásitos, o desde un tejido a otro en células tumorales. Las moléculas que gobiernan el proceso relacionado a la invasión comprenden moléculas de adhesión célula-célula, receptores de integrinas, metaloproteasas de matriz y quemotractantes como la molécula RANTES, las cuales están presentes en células tumorales así como en parásitos. Estas son requeridas para establecer adhesiones célula-célula y célula matriz, desarrollar proteólisis y presentar motilidad (Lauwaet *et al,* 2000).

Asimismo, se han descrito semejanzas entre células tumorales y parásitos a nivel de la capacidad de estos en desarrollar mecanismos de resistencia a diferentes drogas de uso terapéutico. La glicoproteína P ha sido identificada por modular el fenotipo de

multiresistencia a drogas (MDR) tanto en células de diversos tumores así como en los parásitos protozoarios Plasmodium y Leishmania (Pérez -Victoria *et al,* 2002).

Adicionalmente, ciertos parásitos generan estrategias de evasión o regulación del sistema inmune similares a las mencionadas anteriormente para células tumorales. Se ha descrito que la respuesta inmune a infecciones parasitarias mediadas por helmintos a modo de ejemplo, tiene componentes anti-inflamatorios caracterizados por un aumento en citoquinas como IL-10 o TGF-β, promoviendo así la generación de linfocitos T reguladores y por tanto, la evasión a la respuesta inmune (Maizels *et al,* 2004). Por otra parte, parásitos flagelados como *Trypanosoma brucei* evaden la respuesta inmune mediante la expresión de una glicoproteína de superficie, la cual presenta un repertorio de genes, por lo que las poblaciones de parásitos presentan cambios antigénicos, evitando mediante este mecanismo el reconocimiento y eliminación de toda una población mediada por respuestas humorales (Zambrano -villa *et al* 2002).

Además de estos mecanismos biológicos compartidos entre cáncer y parásitos, se han observado similitudes a nivel estructural. Varios antígenos expresados en células tumorales presentan homología a antígenos parasitarios. A modo de ejemplo, el antígeno Sm23, expresado en la superficie de *Schistosoma mansoni,* presenta un elevado nivel de homología a nivel de secuencia y de estructura con respecto al antígeno ME491 presente en melanomas, entre otros tipos de tumores malignos (Wright , *et al* 1990). Asimismo, recientemente se ha descrito que la proteína tropomiosina de *Trichinella spiralis* presenta similitudes con antígenos de la línea celular tumoral de mieloma SP2/0, analizado por reactividad cruzada (Gong *et al*, 2011).

Se han observado similitudes moleculares adicionales entre células tumorales y parásitos, en particular, en lo que refiere a la expresión de estructuras de O-glicosilación incompleta. Los patrones de O-glicosilación observados en cáncer son distintos a las de las células normales, presentando cadenas glucídicas en las glicoproteínas de membrana más cortas que las de las células normales, exponiendo de esta forma antígenos asociados a tumor denominados de O-glicosilación incompleta (Hakomori 2002; Yu 2007, Brockhausen, 2006). Esta modificación en las glicoproteínas de membrana puede deberse tanto a un cambio en la expresión en las enzimas responsables de catalizar los distintos pasos de la glicosilación como en cambios en la expresión de los sustratos para dichas enzimas (Singh , 2006).

Muchos de estos patrones de O-glicosilación incompleta son marcadores tumorales importantes. Entre ellos se encuentran los motivos Tn (GalNAc-α-Ser/Thr), Tk, sialil-Tn (N-acetylneuraminic acid-α6-GalNAc-α-Ser/Thr) y TF Thomsen-Friedenreich disaccharide (Gal-β(1-3)-GalNAc) (Yu, 2007, Van Kooyk *et al*, 2008). La expresión de algunas de estas estructuras por los tumores está correlacionada con un peor pronóstico para el paciente (Freire , *et al* 2002; Brockhausen , 2006). Se ha postulado que la presencia de este tipo de alteraciones en las pautas de modificación postraduccional de las células tumorales les confiere propiedades implicadas con la invasividad y la metástasis, relacionado con la pérdida de adhesión tanto a otras células como a la matriz extracelular y la evasión de las respuestas inmunes (Van Kooyk *et al*, 2008).

Además, se han identificado los motivos Tn, TF, sialil-Tn y Tk en diferentes parásitos (Osinaga, 2007). De hecho, larvas y adultos de *Schistosoma mansoni* presentan el antígeno Tn, (Nyame *et al,* 1987) así como el antígeno TF (Thors *et al* 2006). Adicionalmente, se identificó la expresión de los antígenos Tn y sialil-Tn en extractos tanto de fases larvales como adultas del parásito cestodo *Echinococcus granulosus* agente causal de la hidatidosis (Álvarez Errico, *et al,* 2001) así como la presencia del antígeno TF en el adulto y en la pared del quiste hidático (Casaravilla *et al* 2003, Díaz *et al* 2009). Adicionalmente, se observó la expresión de los antígenos Tn y sialil-Tn en el platelminto trematodo Fasciola hepática, el primero a nivel de testículos y el segundo con una distribución más generalizada (Freire et al, 2003a). Posteriormente se observó la presencia del antígeno sialil-Tn en *Trypanosoma cruzi* (Freire *et al*, 2003b). Más aun, en ciertos parásitos helmintos se describió la presencia del antígeno Tn y Tk (Casaravilla *et al* 2003, Ubillos *et al* 2007). Finalmente, la expresión de antígenos de O-glicosilación incompleta también fue constatada en el parásito cestodo *Mesocestoides corti*, el cual presenta el antígeno Tn en los cordones neuronales laterales y sialil Tn en el tegumento y células del parénquima del mismo (Medeiros *et al*, 2008). Se evidencia así que estos antígenos de O-glicosilación incompleta están ampliamente distribuidos entre distintos parásitos.

Las semejanzas descritas anteriormente tanto a nivel biológico como estructural, podrían conducir a interacciones entre enfermedades causadas por infecciones parasitarias y el desarrollo de cáncer. Como se mencionó anteriormente, la aparición de cáncer puede estar vinculada a mecanismos intrínsecos relacionados a la degeneración

que ocurre naturalmente con la edad, sin embargo, numerosos agentes biológicos han sido asociados con el proceso de carcinogénesis.

Se estima que el 17,8% de los casos de cáncer (1,9 millones de casos) fueron causados por infecciones virales (12,1%), bacterianas (5,6%) o por helmintos (0,1%) (Parkin 2006).

Se han descrito tres mecanismos principales de carcinogénesis mediada por agentes biológicos, definidos como directos o indirectos (World Health Organization International agency for research on cancer, 2011). Dentro de los mecanismos directos, se han establecido ciertos agentes virales, dentro de los que se encuentran algunos subtipos de de la familia del papilomavirus humano (HPV), el virus linfotrófico de células T tipo 1 (HTLV-1) así como los herpesvirus virus de Epstein-Barr (EBV) y Virus asociado a herpes Kaposi sarcoma (KSHV) (World Health Organization International agency for research on cancer, 2011).

Agentes infecciosos pueden ser también ser carcinógenos indirectos causando inflamación crónica, la cual puede generar la producción de quemoquinas, citoquinas y prostaglandinas tanto por células infectadas o del sistema inmunológico y la producción de especies reactivas del oxígeno (que tienen efectos mutagénicos directos), la desregulación del sistema inmune así como promoción de angiogénesis. Se ha descrito que los virus de la hepatitis (HBV y HCV), la bacteria *Helicobacter pylori* así como tres parásitos Schistosoma haematobium, Opistorchis viverrini, y *Clonorchis sinesi* pueden actuar mediante este mecanismo. Por otra parte, agentes biológicos pueden actuar indirectamente promoviendo un ambiente inmunosupresor. Se ha demostrado que la infección por HIV-1 aumenta la incidencia de varios tipos de cáncer humanos, sorprendentemente, la mayoría éstos tienen otra etiología infecciosa, por lo que HIV-1 aumentaría su incidencia considerablemente, siendo los mediados por KSHV y EBV los más susceptibles a la inmunosupresión (World Health Organization International agency for research on cancer, 2011).

Por otra parte, existen asimismo evidencias a nivel epidemiológico que indican que para ciertos casos existe una relación inversa entre el desarrollo de infecciones parasitarias y la aparición de cáncer. En los últimos años de forma independiente, se ha sugerido que la infección por algunos parásitos podría reducir la incidencia de cáncer. Estudios en pacientes infectados con *Echinococcus granulosus* reveló una prevalencia de

cáncer significativamente menor en relación con personas sanas (Akgul *et al,* 2003). Por otra parte, datos clínicos obtenidos de la evaluación de pacientes con megacolon chagásico sugieren que esta patología genera protección contra cáncer de colon (García *et al,* 2003).

Particularmente, el protozoario flagelado *Trypanosoma cruzi* ha sido estudiado en modelos animales y datos epidemiológicos han sido recabados en cuanto a su relación con una menor incidencia de desarrollo de cáncer.

Estudios realizados en modelos animales mediante inducción de cáncer con el carcinógeno 1,2 dimetilhidracina en ratas infectadas de forma crónica con *Trypanosoma cruzi*, mostraron una menor incidencia de cáncer de colon en relación con los animales no infectados (Oliveira *et al,* 2001). Asimismo, se reportó actividad anti-tumoral utilizando la cepa de *T. cruzi* CH4, el cual inhibe el crecimiento y las metástasis del linfoma sólido L5178Y-R cuando es transplantado a ratones de la cepa Balb/C (Mel´nikov *et al* 2004).

Por otra parte, utilizando dos modelos de cáncer en rata; cáncer de colon inducido por dimetilhidracina y cáncer de mama inducido por nitrosometilurea se observó que la inmunización con extractos de *T. cruzi* durante la carcinogénesis induce una importante respuesta protectora anti-tumoral, que determina el desarrollo de un menor número de lesiones malignas en los animales inmunizados en comparación con los no inmunizados (Ubillos *et a,l* 2008).

Adicionalmente, se evaluó la posibilidad de generación de protección ante el desarrollo de tumores mediante la inmunización con un extracto proteico de epimastigotas de la cepa Dm28c de *Trypanosoma cruzi* en modelos murinos. Para ello se administraron células tumorales de colon o pulmón (líneas celulares CT26 y LL/2 respectivamente) a ratones inmunizados previamente con dicho extracto. En el modelo de cáncer de colon, se observó una reducción en el tamaño tumoral en los ratones inmunizados respecto a aquellos del grupo control, mientras que en cáncer de pulmón, la inmunización con *T. cruzi* previno la aparición de tumores en un 60% de los animales tratados, como se observa en la figura 3 (Monin, 2011). A partir de este se estudiaron los mecanismos efectores del sistema inmune implicados en dicha respuesta anti-tumoral, sugiriéndose que los linfocitos T CD8 y células Natural Killer con capacidad citotóxica estarían implicadas (Monin, 2011).

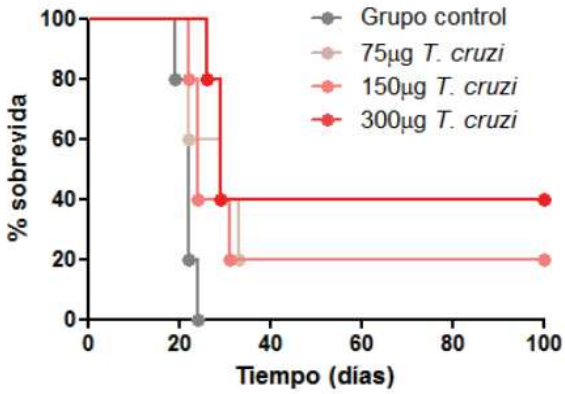


Figura 3 Sobrevida de los animales en los ensayos de protección a LL/2. Se muestran las curvas de Kaplan-Meier para los grupos experimentales (n=5 por grupo) inmunizados con 75, 150 y 300 µg de extracto de T. cruzi o grupo control, en hidróxido de aluminio, tomándose como día o el día de implantación de las células. Las diferencias entre las curvas de sobrevida de los animales tratados y los animales control fueron significativas para los animales inmunizados con 300 µg de extracto de *T. cruzi* (p=0,0495) en el modelo LL/2 (Adaptado de Monin, 2011).

Más aún, mediante inmunohistoquímica se comprobó que sueros de animales sanos inmunizados con *T. cruzi,* desarrollan anticuerpos que reconocen cáncer de colon y mama, pero no los respectivos tejidos normales. Mediante citometría de flujo se observó además que estos anticuerpos reconocen líneas celulares de cáncer de colon y mama, mientras que los sueros pre-inmunes no (Ubillos L., Tesis de Doctorado en curso). Se muestra en la figura 4 análisis inmunohistoquímico en cáncer de colon y tejido normal.

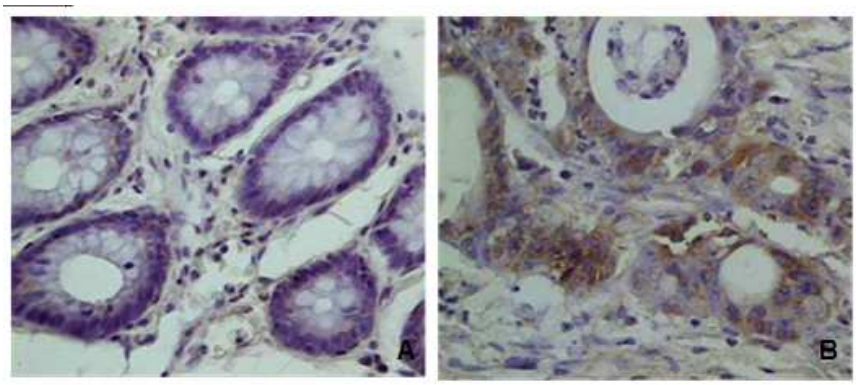


Figura 4 análisis mediante inmunohistoquímica de tejidos humanos de colon usando anticuerpos generados contra T. cruzi. A. mucosa colónica normal, B, cáncer de colon.

Trypanosoma cruzi

Finalmente, en el presente trabajo se utilizó el parásito *Tripanosoma cruzi* a nivel de antígenos proteicos. Este parásito es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, la más importante causada por parásitos en América Latina con un estimativo de alrededor de 18 millones de personas infectadas (Buscaglia *et al,* 2006). Se trata de un protozoario flagelado del orden Kinetoplastidia, caracterizado por la presencia de un solo flagelo y una sola mitocondria, dentro de la cual su genoma se encuentra ordenado en una compleja y compacta red denominada cinetoplasto.

El ciclo biológico del parásito comprende un hospedero invertebrado de la familia Reduviidae (la mayoría del genero triatoma) el cual actúa como vector y un hospedero mamífero que puede ser el hombre. Brevemente, en el insecto hematófago, el parásito se presenta en dos formas principales; epimastigotas replicativos en el intestino de los mismos y tripomastigotas metacíclicos que se acumulan en la región distal del intestino. Los últimos son depositados en el hospedero mamífero a través de las heces del insecto, mientras éste tiene acceso al torrente sanguíneo a través de una herida o membranas mucosas, subsecuentemente invade una variedad de células, mediante la formación de una vacuola parasitófora. Dentro de la célula, el parásito se diferencia en su forma amastigota, escapando de la vacuola. Luego de varias divisiones binarias, los amastigotos se diferencian en tripomastigotos (diferente a las formas metacíclica) los que se liberan al flujo sanguíneo luego de la lisis celular, pudiendo infectar nuevas células, entre las que se encuentran los macrófagos. El ciclo se cierra cuando el vector invertebrado se alimenta de un individuo infectado (Buscaglia *et al,* 2006).

Objetivos

Ante la observación de que la inmunización con extractos de *T. cruzi* reduce la incidencia de cáncer y que se generan en los animales inmunizados anticuerpos capaces de reconocer específicamente células tumorales; es posible plantear la hipótesis de que moléculas de dicho extracto puedan llevar a la inducción de respuestas inmunes anti-tumorales más eficientes.

Apoyado en los antecedentes antes mencionados, el objetivo general de este trabajo es profundizar en la caracterización molecular de los antígenos compartidos entre cáncer y parásitos. Particularmente los antígenos asociados a cáncer de pulmón murino que son reconocidos por anticuerpos generados contra extractos de *T. cruzi.* Daremos prioridad al estudio en cáncer de pulmón, dada su incidencia a nivel epidemiológico. Asimismo, estudios de carcinogénesis animal y caracterización de líneas celulares apoyan fuertemente la existencia de protección generada por extractos proteicos *de T. cruzi* y la presencia de antígenos compartidos entre células cancerosas y *T. cruzi* como posible mecanismo implicado en este proceso.

Objetivos específicos:

1) Evaluar la reactividad cruzada entre la línea tumoral LL/2 y extractos proteicos de *T. cruzi*, comparando la misma frente a muestras de pulmón normal.

2) Identificar los antígenos compartidos entre la línea celular LL/2 de cáncer de pulmón murino y *T. cruzi,* comparando los mismos respecto a muestras de pulmón normal caracterizados por proteómica y espectrometría de masa.

3) Asimismo, optimizar técnicas experimentales para purificar los antígenos reconocidos por anticuerpos policlonales específicos anti-*T. cruzi* para confirmar la identidad de los mismos.

Materiales y Métodos

Líneas celulares

Las líneas celulares de origen murino LL/2 (cáncer de pulmón, cepa C57Bl/6) fueron adquiridas en American Type Culture Collection (ATCC). Las células fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco´s modified Eagle´s medium, Gibco), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SBF), 2mM de L-glutamina y 1mM de piruvato de sodio, en estufa a 37°C en presencia de 5% de CO_2.

Preparación de extractos celulares de LL/2

Células LL/2 procedentes de cultivos en fase exponencial de crecimiento fueron lavadas 2 veces con PBS y posteriormente incubadas en una solución hipotónica (Tris 10mM, KCl 5mM, $CaCl_2$ 2mM, $MgCl_2$ 1mM complementado con inhibidores de proteasas) durante 30 minutos en hielo. Luego, las muestras fueron sonicadas con 6 pulsos de 10 segundos, espaciados por 10 segundos de descanso, a 10% de amplitud en hielo. El material extraído se centrifugó a 4600 rpm por 10 minutos y el sobrenadante se almacenó a -20°C hasta su uso.

Los extractos celulares para electroforesis bidimensional se generaron a partir de células procedentes de cultivos en fase exponencial de crecimiento que fueron también lavadas 2 veces con PBS y posteriormente incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente con buffer de lisis (Tris 30mM, Tiourea 2M, Urea 7M, CHAPS 4% (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane sulfonate) pH 8,5 con el agregado de un cóctel de inhibidores de proteasa. (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 14000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante se conservó a -80°C hasta su uso.

Preparación de extracto proteico de pulmón normal

Se generó adicionalmente, un extracto proteico a partir de una muestra de pulmón murino de la cepa C57BL/6. Para ello, se extrajeron los pulmones de un ratón virgen de 6 semanas los cuales fueron colocados en un tubo eppendorf y disgregados con la ayuda de un mortero descartable en buffer de lisis (Tris 30mM, Tiourea 2M, Urea 7M, CHAPS 4 % pH 8,5 con inhibidores de proteasas). Tras 30 minutos de incubación, la muestra se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos, se recuperó el sobrenadante que se cuantificó y conservó a -80°C hasta su uso.

Preparación de extracto de *Trypanosoma cruzi*

Epimastigotas de la cepa Dm28 de *T. cruzi* procedentes de cultivo en medio LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SBF) en fase exponencial fueron empleadas. Para preparar el extracto celular, los parásitos fueron lavados 3 veces en buffer fosfato salino (PBS NaCl 137 mM, KC 2.7 mM l, Na2HPO44.3 mM, KH2PO 41.47 mM) y posteriormente fueron incubados en buffer DOC (desoxicolato 1%, glicina 15M, NaCl 0,5M pH 9,0) durante 1 hora a temperatura ambiente, 30 minutos a 37°C y finalmente 30 minutos a 4°C. El material extraído con el desoxicolato fue centrifugado a 20000g por 1 hora a 4°C y el sobrenadante fue almacenado a -80°C hasta su uso.

Cuantificación de proteínas

La concentración proteica de los extractos parasitarios y de las líneas celulares utilizadas fue determinada mediante el método colorimétrico del ácido bicinconínico (BCA) (Smith *et al* 1985). En cada caso, 10µl extracto fue incubado junto a 200µl de BCA-CuSO4 en una relación 50:1 durante 30 minutos a 37°C, seguidamente la absorbancia de las muestras fue medida a 570nm. De forma paralela, se realizó una curva de calibración utilizando BSA en el rango 1-0,1 µg/µl.

Las muestras preparadas para electroforesis bidimensional fueron cuantificadas por el método de Bradford (Bradford 1976) ya que la concentración elevada de Urea presente en el buffer de lisis utilizado interfiere con el método de BCA. De esta forma,

5µl de muestra fueron incubados junto con 150 µl de reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), durante 5 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 595nm. Asimismo se realizó además una curva de calibración utilizando BSA en el rango 0,05-0,5 µg/µl.

Producción de anticuerpos policlonales anti-*Trypanosoma cruzi*

Con el fin de disponer de anticuerpos con reactividad anti-*T. cruzi* para los distintos ensayos, se inmunizó un conejo vía subcutánea con 300µg de extracto de *Trypanosoma cruzi* en 500µl de adyuvante, la primera inmunización se realizó con el adyuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), mientras que las dos inmunizaciones posteriores a los 15 y a los 30 días desde la primera se utilizó el adyuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Se extrajo sangre antes de la primera inmunización, siendo éste el suero pre-inmune. A los 15 días de la segunda y de la tercera inmunización se obtuvo sangre y se evaluó el título de anticuerpos que presentaran reactividad frente a un extracto de *T. cruzi* por ELISA. Para ello, las muestras de sangre se centrifugaron a 1500g por 30 minutos conservándose el sobrenadante.

Purificación de anticuerpos policlonales anti- *T.cruzi*

Purificación de IgGs por cromatografía de afinidad con proteína A

A efectos de obtener anticuerpos policlonales con reactividad frente a *Trypanosoma cruzi* a partir del suero policlonal generado en conejo, primeramente se purificaron los anticuerpos totales IgG presentes en el suero. Para ello se utilizó proteína A ligada a agarosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) la cual deriva de la pared de *Staphyloccocus aureus* y contiene regiones de unión a la región Fc de las inmunoglobulinas de isotipo IgG, la interacción es pH dependiente, permitiendo su posterior disociación (GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2007).

Se utilizaron 3 ml de agarosa ligada a proteína A, la cual fue empaquetada en una columna y equilibrada con binding buffer (NaH_2PO_4 0,02M, NaCl 0,15M pH 8). Adicionalmente, se realizó una dilución del suero en el mismo buffer y se dejó

recirculando la muestra por la columna con una bomba persitáltica durante toda la noche a 4°C. Posteriormente la columna fue lavada con 10 volúmenes de columna (CV) de binding buffer (30ml) guardando las muestras que presentaran una densidad óptica (DO) mayor a 0,05 a 280 nm para su posterior análisis. Los anticuerpos fueron recuperados mediante lavados con 5 VC de buffer de elución (NaH_2PO_4 0,02M, Ácido cítrico 0,1M pH 3) conservándose los eluídos en alícuotas de 2ml, a los que se les midió la DO a 280nm y el pH fue neutralizado inmediatamente con una solución de Tris-HCl 1M pH 9.

Luego de la purificación la columna fue recuperada mediante lavados sucesivos con 10 VC de buffer Tris 0,1M NaCl 0,5M pH 8, buffer Acetato 0.1M pH4, NaCl 0,5M y finalmente fue almacenado en binding buffer y azida de sodio a 4°C.

La actividad de los diferentes eluídos fue evaluada mediante ELISA indirecto como se describirá más adelante.

Purificación de anticuerpos anti-*T. cruzi* .

Con el fin de obtener la fracción de anticuerpos que presentan afinidad por *T. cruzi* de las IgGs totales purificadas mediante proteína A, se preparó una columna de sefarosa activada con bromuro de cianógeno CN-Br (Amersham) ligada a proteínas de *T. cruzi*. La sefarosa activada con CN-Br contiene grupos éster cianato reactivos, que pueden interaccionar bajo ciertas condiciones con grupos amino primarios o similares de diferentes ligandos, formando enlaces de tipo isourea de forma espontánea, resultando en una unión estable que asegura que el ligando no se hidrolice de la matriz (GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2007).

Para el armado de la columna, 20 mg de extracto de *T. cruzi* fueron dializados en buffer Bicarbonato ($NaHCO_3$ 0,1 M pH 8,7) durante toda la noche a 4°C, posteriormente se ajustó la concentración de NaCl del ligando a 0,5M. Paralelamente, se resuspendieron 0,57g de sefarosa, equivalentes a 2ml de gel hidratado en HCl 1mM, en agitación durante 15 minutos, se centrifugó durante 10 minutos a 1500 rpm y luego la sefarosa fue lavada con buffer bicarbonato conteniendo 0,5M de NaCl.

La sefarosa activada y el extracto de *T. cruzi* se incubaron durante toda la noche a 4°C en rueda mágica. El sobrenadante se conservó para cuantificar la proporción de ligando unido a la sefarosa. Posteriormente se realizaron lavados con 5 volúmenes de

columna (CV) con buffer bicarbonato, los grupos activos libres de la resina fueron bloqueados con una solución de Tris-HCl 0,1 M pH 8 mediante incubación en agitación por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 3 ciclos de lavados, los que consistieron en lavados alternados con buffer Bicarbonato y buffer Acetato (CH_3COONa 0,1M, NaCl 0,5M pH 4) verificando que la DO de los eluídos a 280nm fuera menor a 0,05.

El pool de IgGs obtenidos a partir del suero policlonal de conejo generado a partir de los eluídos que presentaron actividad por ELISA, se incubó durante toda la noche en batch con la sefarosa ligada al extracto de *T. cruzi*, previo ajuste del pH de la muestra, mediante dilución en buffer bicarbonato. La resina fue empaquetada para la elución, realizándose lavados con 20 VC de buffer carbonato, seguidos de 5 VC de buffer de pre-elución (fosfato 10mM pH 8) y 5 VC de buffer de elución (Trietilamina 0,1 M pH 11,5). Los eluídos se almacenaron en alícuotas de 500µl, se midió la DO a 280nm y se neutralizó el pH con una solución de buffer Fosfato 1M pH 6,8. Se evaluó la actividad de los eluídos por ELISA, así como su pureza por SDS-PAGE y para luego hacer un "pool" de los mismos y se cuantificaron por el método de BCA.

Se recuperó la columna mediante tres ciclos de lavados sucesivos con buffer acetato 0,1 M NaCl 0,5 M pH 4, buffer tris-Hcl 0,1 M, NaCl 0,5M pH 8,5 y finalmente la columna se conservó en binding buffer conteniendo 20% etanol.

Purificación de antígenos tumorales

Los antígenos tumorales de la línea celular LL/2 fueron purificados mediante cromatografía de afinidad, con anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* inmovilizados a sefarosa. Para ello, los anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* purificados según se describió anteriormente fueron inmovilizados en una columna de sefarosa activada por CN-Br de forma análoga a la descrita para la columna de afinidad a *T. cruzi*. Brevemente, se utilizaron 0,57g de sefarosa activada con CNBr la que se conjugó a 4 mg de inmunoglobulinas. Simultáneamente, se ajustó el pH a 6mg de un extracto proteico de la línea celular LL/2 mediante dilución en buffer bicarbonato el cual se incubó con la resina en batch durante toda la noche. La elución de las muestras fue realizada utilizando los buffers de pre-elución y elución antes mencionados. En este caso las eluciones se efectuaron únicamente a pH básico.

Posteriormente, se concentró la muestra mediante precipitación con ácido tricloroacético (TCA) y acetona (Damerval *et al*, 1986). Brevemente, se agregó igual

volumen de ácido tricloroacético 20%(w/v) en acetona conteniendo 0,07% de DTT durante 1h a 4°C. Se centrifugó a 13000g durante 10 minutos a 4° y luego se aspiró el sobrenadante. Los pellets fueron lavados 2 veces en acetona fría mantenida a -20°C conteniendo también 0,07% de DTT removiendo así TCA residual. La acetona remanente se removió por secado de los pellet, el cual fue resuspendido en buffer para electroforesis bidimensional. El contenido proteico fue cuantificado por el método de Bradford.

ELISA

La reactividad de los sueros del conejo inmunizado con extracto de *T. cruzi* y la evaluación de la purificación de anticuerpos anti *T. cruzi* se realizó mediante la técnica de ELISA. Para ello, se sensibilizaron placas de ELISA de fondo plano (Nunc) con extracto parasitario (10µg/pocillo) en buffer carbonato ($NaHCO_3$-Na_2CO_3 0,05M pH 9,6), durante toda la noche a temperatura ambiente en campana. Los sitios de unión inespecíficos se bloquearon con gelatina 1% en PBS por 2 horas a 37°C. A continuación, se adicionaron diluciones seriadas de los sueros (1/100- 1/12800) o de los eluídos de cromatografía (1/100) en buffer PBS-Tween-20 0,1%-gelatina 0,5%. Las placas fueron incubadas por 1 hora a 37°C y posteriormente incubadas con una dilución 1/2000 de anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa (Dako) en buffer PBS-Tween-20 0,1%-gelatina 0,5%. En todos los casos posterior a cada incubación se realizaron tres lavados con buffer PBS-T 0,1%. La actividad peroxidasa se evidenció incubando los pocillos con ABTS (2,2-azino-bis(ácido 3-etilbenzo-tiazolino-6-sulfónico)) y H_2O_2 24% en buffer citrato fosfato 0,1M pH 5,0. La reacción colorimétrica se desarrolló durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, determinándose la absorbancia a 405nm.

En todos los casos, se realizaron controles para verificar que la unión de anticuerpos fuera específica. Se sensibilizaron pocillos sin antígenos, solamente conteniendo buffer carbonato para determinar una posible reactividad inespecífica de los anticuerpos primarios con dicho buffer. Asimismo, se evaluó la reactividad en ausencia de anticuerpos primarios incubando únicamente con PBS-Tween-20 0,1%-gelatina 0,5% en este caso evaluando la posible reactividad inespecífica entre el anticuerpo secundario y el antígeno adsorbido.

Finalmente, para determinar la absorbancia de las muestras, se empleó un pocillo blanco al que se le agregó únicamente los reactivos cromogénicos.

SDS-PAGE

La pureza de los eluídos obtenidos por cromatografía de afinidad fue evaluada mediante electroforesis en geles de poliacrliamida en condiciones reductoras con dodecil sulfato de sodio. Los distintos eluídos fueron diluidos en buffer de corrida (β.mercapto etanol 25%, SDS 2.5%, Glicerol 50%, Buffer Tris Hcl 0.125M pH 6.8, Azul de bromofenol 0.1mg/ml) y se incubaron a 99ºC durante 3 minutos. Dado que la concentración de los eluídos fue medida a 280nm, se sembraron en todos los casos 30µl de cada muestra en geles de poliacrilamida al 12% y se separaron a 150V durante 1 hora y media. Posteriormente los geles fueron incubados durante toda la noche con Coomasie Blue R 250 y desteñidos mediante incubación en agitación con solución de Destain (Etanol 45%, Acido acético 10%).

Western Blot

A los efectos de evaluar la existencia de similitudes a nivel antigénico entre las células tumorales y *T. cruzi*, se realizó una caracterización mediante Western Blot monodimensional de las mismas. Para ello se emplearon extractos proteicos de la línea LL/2 así como extracto de pulmón murino normal, las cuales fueron desnaturalizadas mediante dilución de las mismas en buffer de corrida reductor e incubación a 99°C durante 3 minutos. 20µg de extracto proteico se sembraron en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras y se separaron a 150V durante 1

hora y media. Posteriormente el gel se equilibró en buffer de transferencia (Tris base 25mM, Glicina 192mM, etanol 20%) durante 15 minutos y luego las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa Hybond-C (GE Healthcare) mediante electrotransferencia semi-seca durante 1 hora a 20 V. Se verificó la transferencia mediante tinción de la membrana con una solución de Rojo Ponceau, permitiendo de esta forma cortar las bandas según fuera necesario. A continuación los sitios inespecíficos fueron bloqueados con una solución de seroalbúmina bovina (BSA) al 3% en PBS durante toda la noche a 4°C. A continuación las membranas fueron incubadas con suero anti. *T*-

cruzi dilución 1/750 en buffer PBS-Tween 20 0,1% BSA 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Adicionalmente, se evaluó la reactividad de los anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* purificados por cromatografía de afinidad, utilizando una dilución 1/750. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo anti-conejo conjugado a peroxidasa (Dako) durante 1 hora a temperatura ambiente en una dilución 1/2000 en buffer PBS-Tween 20 0,1% BSA 0,1%. En todos los casos entre incubaciones se realizaron 3 lavados con buffer PBS-Tween 20 0,1%. Se revelaron las bandas con el reactivo quimioluminiscente ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare), incubando durante 1 minuto la membrana y exponiendo la misma junto con un film (Amersham Hyperfilm ECL GE) en oscuridad durante 1 o 5 minutos y revelando los spots con un equipo Hyper processor (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia)

Como control positivo de la unión del anticuerpos, se corrieron 5µg de extracto de *T. cruzi*. Asimismo, como control negativo de la técnica se utilizó como anticuerpo primario, suero pre-inmune de conejo.

Se evaluó asimismo mediante Western Blot la purificación de anticuerpos IgG de conejo anti-*T. cruzi*. Para ello, se sembraron 30 µl de eluídos que presentaron actividad por ELISA, se separaron por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%. Luego de la transferencia la cual se realizó como se describió anteriormente, se incubó la membrana con anticuerpo anti-conejo conjugado a peroxidasa (Dako) durante 1 hora a temperatura ambiente en una dilución 1/2000 en buffer PBS-Tween 20 0,1% BSA 0,1%., revelándose las bandas de forma análoga a la descrita.

Electroforesis bidimensional

Con el fin de identificar las proteínas sujetas a reactividad cruzada entre la línea celular tumoral, las proteínas de pulmón normal o las proteínas purificadas por cromatografía de afinidad con anticuerpos anti-*T. cruzi*, se realizaron geles bidimensionales para su posterior análisis por espectrometría de masa. Extractos proteicos fueron separados en primer lugar de acuerdo a su punto isoeléctrico, utilizando tiras de 7 cm (Immobiline drystrips, GE Healthcare), en un rango no lineal de pH de 3-11. 48µg de proteína de la línea celular LL/2, de pulmón normal así como los antígenos purificados por cromatografía de afinidad, fueron diluidos en solución de

rehidratación (8M Urea, 0,5% CHAPS, 0,3% DTT, 0,5% IPG buffer (GE Healthcare) y 0,002% azul de bromofenol) y sembrados en strip holders, a las que se incorporaron las tiras y se cubrieron con aceite mineral para evitar evaporación y precipitación de la urea del buffer. Se realizó un isoelectroenfoque utilizando un sistema IPGPhor (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). En primer lugar, las tiras fueron rehidratadas de forma activa a 30V durante 17 horas, posteriormente se siguió el protocolo según el fabricante del equipo, el cual consistió en step and hold a 300 V por 30 minutos, gradiente a 1000 V por 30 minutos, gradiente a 5000V por 1:20hs y un último paso de step and hold a 5000V hasta 2000Vh. Luego del isoelectroenfoque, las tiras fueron equilibradas por 15 minutos en buffer de equilibración (6M Urea, 75mM Tris-HCl pH 8,8, 29,3% glicerol, 2% SDS, 0,002% azul de bromofenol) conteniendo DTT 10mg/ml como agente reductor de enlaces disulfuro y posteriormente se incubaron en el mismo buffer conteniendo iodoacetamida 25mg/ml, agente alquilante el cual impide la reformación de enlaces disulfuro. (GE Healthcare, 2004)

Las proteínas fueron posteriormente separadas por su peso molecular, posicionando las tiras sobre geles de policarilamida al 12,5%, mantenidas en su lugar con una solución sellante de agarosa (Agarosa 0,5%, Azul de bromofenol 0,002%) en buffer de corrida (Tris base 1,5M) . El marcador de peso molecular fue sembrado en papel de filtro y colocado sobre el gel, evitando su difusión. Los geles fueron corridos a 10mA por gel durante 15 minutos y luego a 20 mA por gel hasta que el buffer de corrida se situara a 1cm del borde inferior del gel.

Luego de la corrida, uno de los geles se tiñó para la visualización de las proteínas. Para ello, se fijaron las proteínas del gel durante 30 minutos con una solución de ácido acético 10%, Etanol 40% y luego se incubó durante toda la noche en agitación continua a temperatura ambiente con una solución de Coomasie Blue coloidal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y 20% de etanol. Posteriormente, se destiñó el gel mediante lavados sucesivos con agua ultrapura mili-Q en agitación.

A los efectos de identificar las proteínas sujetas a reactividad inmunológica cruzada entre parásitos y células tumorales, se corrieron dos geles en paralelo, uno teñido con Coomasie Blue los geles fue utilizado para análisis por Western Blot siguiendo el protocolo que se indicó anteriormente. Adicionalmente se realizó como control negativo sobre la misma membrana un western Blot con el suero pre-inmune anti-*T. cruzi*. Para

ello, la membrana fue strippeada incubándola durante 10 min a 50°C en agitación en buffer de stripping (Tris base 62,5mM pH 6,7, 2%SDS y 100mM de β-mercaptoetanol), luego de lo cual se lavó con PBS-Tween20 0,1% y se bloqueó con solución de bloqueo durante 1 hora a 37°C.

Espectrometría de masa

Los spots de las proteínas de interés fueron escindidas del gel y sujetas a una digestión dentro del gel con tripsina de páncreas bovino de calidad para usar en secuenciado (Roche) a una concentración final de 20 ng/µl en bicarbonato de amonio 50 mM (pH 8.3) el cual se dejó incubando durante toda la noche a 37°C. Los péptidos fueron extraídos del gel mediante una mezcla de bicarbonato de amonio 0,2M:acetonitrilo. Las mezclas de péptidos trípticos fueron concentradas en Speed-Vac, y purificadas utilizando un Zip- Tip C18 (Millipore) activado con acetonitrilo 50% y equilibrado con TFA 0.1%. Luego de la adhesión de los péptidos y de lavar el Zip-Tip con TFA 0.1%, las proteínas fueron eluídas con 3 µl de una solución saturada de ácido _-ciano-4-hidroxicinámico (Sigma) en acetonitrilo 60% conteniendo TFA 0.1% y colocadas directamente sobre una placa de MALDI-TOF. Se dejó secar la mezcla y se analizó con un espectrómetro de masa 4800 MALDI TOF/TOF Analayzer, operado en el modo reflector. El mapa peptídico obtenido para cada muestra se comparó con las bases de datos no-redundantes conocidas de digestiones trípticas de proteínas de SwissProt (http://us.expasy.org) o de NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov), utilizando la herramienta en su forma "online" del programa MASCOT en http://www.matrixscience.com. Algunos péptidos fueron fragmentados por MS/MS para así determinar su secuencia parcial o total y facilitar asi la identificación de las proteínas de interés.

Resultados

Producción de anticuerpos policlonales anti-*T. cruzi*.

El suero de conejo generado contra un extracto proteico de *T. cruzi* fue evaluado mediante ELISA. Se muestra en la figura 5 los valores de absorbancia obtenidos para el suero pre-inmune (muestra tomada al día 0), el suero luego de la segunda inmunización y el obtenido luego de la última inmunización, utilizado para el resto de los ensayos. Los valores se grafican en todos los casos en función de la dilución.

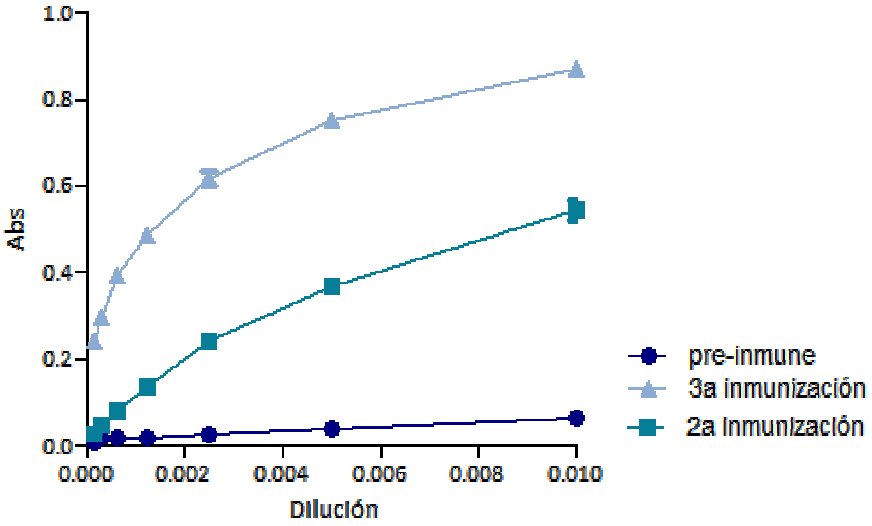


Figura 5 Reactividad de sueros de conejo frente a *T. cruzi* evaluados por ELISA. Se grafica la absorbancia a 450 nm frente a dilución de muestras de suero de conejo pre-inmune, luego de la segunda y tercera inmunización con extracto proteico de *T. cruzi.*

Se observa un aumento en la reactividad en las muestras respecto al suero pre-inmune, después de la segunda y tercera inmunización, confirmándose así la reactividad del suero frente al extracto de *T. cruzi* para el cual fue generado.

Purificación de anticuerpos anti-*T. cruzi.*

Purificación de IgGs por cromatografía de afinidad con Proteína A-agarosa

En primer lugar se purificaron las inmunoglobulinas de isotipo IgG a partir del suero policlonal generado contra antígenos de *T. cruzi*. Luego de recircular la columna durante toda la noche con dicho suero y eluir con el buffer adecuado, se evaluaron las fracciones midiendo su densidad óptica a 280 nm, determinando por tanto el contenido proteico de los mismos. Se muestra en la figura 6 el cromatograma obtenido donde puede observarse un pico en los primeros eluídos (2-4), lo que indicaría que la mayoría de las inmunoglobulinas eluyen de la columna en las primeras fracciones recuperadas.

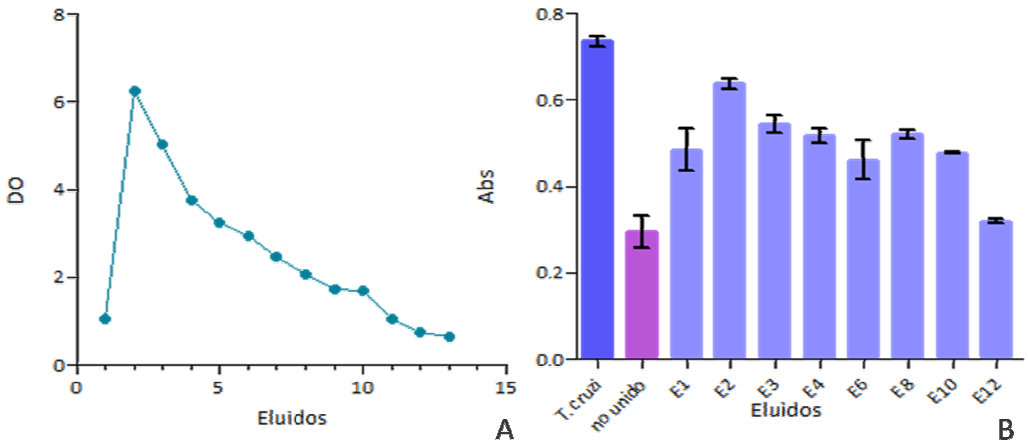


Figura 6 Purificación de IgGs por cromatografía de afinidad con Proteína A-agarosa. A. Densidad óptica medida a 280nm de los eluídos. B. Reactividad de los eluídos frente a extracto de *T. cruzi* evaluado por ELISA. Se grafica la absorbancia de las muestras a 405nm.

La actividad inmunológica de los eluídos se evaluó mediante ELISA, sensibilizando la placa con extracto de *T. cruzi*, la absorbancia de los mismos se muestran en la figura 6. Puede observarse que la actividad de la fracción no unida respecto a la fracción inicial, (indicada como *T. cruzi*) presenta una disminución en la absorbancia, lo que implica no se logró purificar todas las inmunoglobulinas de la muestra con reactividad frente a *T. cruzi*, incluso luego de recircular la fracción no unida por la columna y eluir las IgGs remanentes. Sin embargo, se observa que la actividad de los eluídos es análoga a la del suero inicial, demostrando así que, las inmunoglobulinas purificadas contienen anticuerpos anti-*T. cruzi.*

A continuación se evaluó la pureza de las fracciones obtenidas mediante SDS-PAGE y tinción con Coomassie blue. Se aprecia en la figura 7 que los eluídos presentan dos bandas de alrededor de 60kDa y 28kDa, lo que es consistente a inmunoglobulinas desnaturalizadas, pudiendo corresponder a las cadenas pesadas y livianas de las mismas. Sin embargo también se aprecia la presencia de otras bandas de mayor peso molecular, las que pueden corresponder a otros componentes mayoritarios del plasma sanguíneo como la albúmina. De cualquier manera, dado que luego se purificaron las inmunoglobulinas anti-*T. cruzi,* se desestimó la presencia de las mismas.

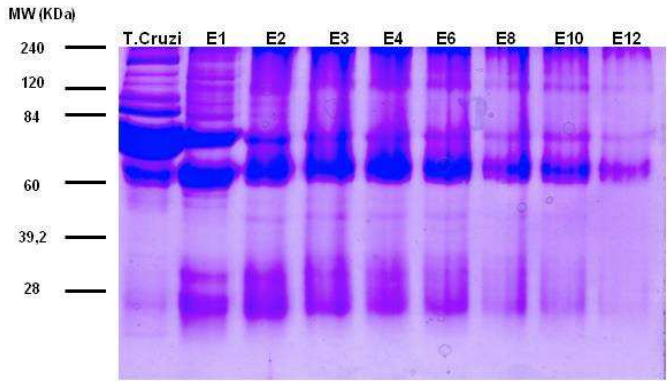


Figura 7. SDS-PAGE de eluídos de cromatografía de afinidad proteína A-agarosa, tinción con coomasie Blue.

Purificación de IgGs anti-T. cruzi por cromatografía de afinidad con sefarosa activada con CNBr.

Se armó una columna utilizando sefarosa activada con CNBr a la cual se ligaron 20mg de extracto proteico de *T. cruzi* con el fin de purificar de forma selectiva aquellos anticuerpos que presentaran afinidad específica contra dichas proteínas a partir de las IgGs totales purificadas anteriormente. Se hizo un pool de los eluídos que presentaron actividad, se incubaron las inmunoglobulinas y finalmente, se eluyeron las proteínas retenidas en la columna en dos condiciones de pH diferente. Se midió la densidad óptica de las fracciones a 280nm para determinar el contenido proteico de las mismas y se muestra en la figura 8.A el cromatograma obtenido. Se aprecia un pico entre los eluídos 2 y 6 que corresponder a eluciones a pH básico, mientras que disminuye y se mantiene constante la densidad óptica cuando los eluídos se realizaron a pH2,5.

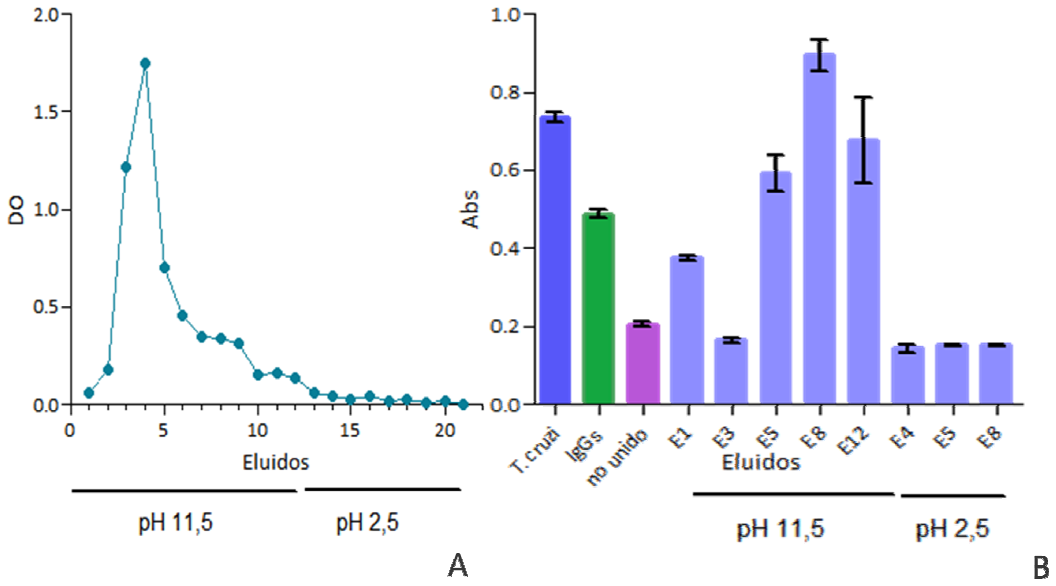


Figura 8 Purificación de IgGs anti-*T. cruzi* por cromatografía de afinidad con sefarosa ligada a *T. cruzi* Densidad óptica medida a 280nm de los eluídos. B. Reactividad de los eluídos frente a extracto de *T. cruzi* evaluado por ELISA. Se grafica la absorbancia de las muestras a 405nm.

A continuación se evaluó la actividad inmunológica de los distintos eluídos mediante ELISA en las mismas condiciones que las descritas para la purificación de IgGs la que se muestra en la figura 8B. Se evidenció nuevamente que los eluídos presentan actividad, sin embargo se observa una clara diferencia entre los eluídos a pH básico respecto a los obtenidos a pH ácido. A partir de estos resultados, las purificaciones siguientes utilizando este tipo de columnas se efectuó únicamente a pH 11.5, donde se recuperó la mayor parte de las IgGs. Adicionalmente, los eluídos que presentaron mayor actividad (5-8), no son los que tuvieron mayor densidad óptica a 280nm. Esto podría estar relacionado con la afinidad de los anticuerpos, siendo los que interaccionan con menor afinidad los que eluyen antes, mientras que los de mayor afinidad aparecen en siguientes eluciones. Adicionalmente, se constata que parte de los anticuerpos quedaron en la fracción no unida, pudiendo deberse esto a que se superó la capacidad de la columna utilizada respecto a la cantidad de inmunoglobulinas presentes en la muestra.

Finalmente, se realizó un SDS-PAGE de los eluídos así como un Western Blot para evaluar la pureza de cada fracción. Como puede verse en la figura 9, el perfil observado en el SDS-PAGE presenta las bandas de pesos moleculares entre 60KDa y 28KDa observadas en la purificación de IgGs. Cabe destacar además que no se observan bandas

de peso molecular mayor que si estaban presentes en los eluídos de la purificación de IgGs y que puede verse en el primer carril. Dado que las bandas obtenidas fueron muy tenues, se verificó la presencia de anticuerpos mediante western-Blot, donde se observó únicamente una banda clara de alrededor de 60KDa. Esta banda puede corresponder a la cadena pesada de las IgGs. Esto puede deberse en parte a que el anticuerpo utilizado ligado a peroxidasa está dirigido a la región constante de las inmunoglobulinas de conejo. En este caso no fueron analizados los eluídos obtenidos a partir de pH ácido, dada la baja densidad óptica presentada y actividad inmunológica por ELISA.

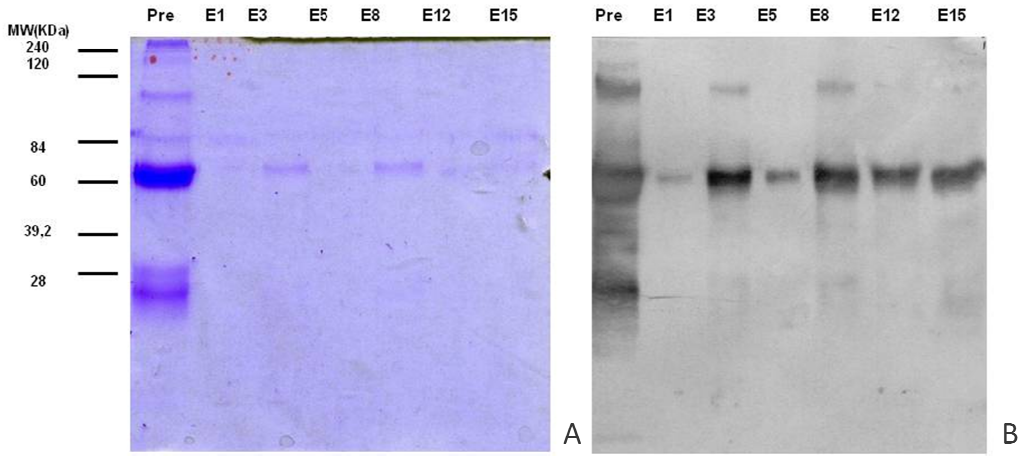


Figura 9 Evaluación de la pureza de los eluídos purificados por cromatografía de afinidad por SDS-PAGE y Western-Blot. A. SDS-PAGE de eluídos a pH básico, B Western Blot de los mismos.

Reactividad cruzada LL/2 *T-cruzi.*

Western Blot monodimensional

Con el fin de determinar si el suero anti-*T. cruzi* desarrollado en conejo es capaz de reconocer proteínas tumorales, se realizó un Western Blot según el protocolo descrito en la sección Materiales y Métodos. De esta forma se pudo analizar el patrón de proteínas tumorales reconocidas por anticuerpos anti- *T. cruzi*. Se corrió el extracto de *T. cruzi* como control positivo de la técnica y se incubó además con el suero extraído en el día 0 de las inmunizaciones (suero pre-inmune) como control negativo. Asimismo, se corrió una muestra de proteínas extraídas a partir de pulmón normal de ratón para analizar si las proteínas reconocidas por el suero son expresadas únicamente por las células tumorales o

si también se expresan en el respectivo tejido normal. Se muestra en la figura 10 el gel obtenido a partir de estas muestras.

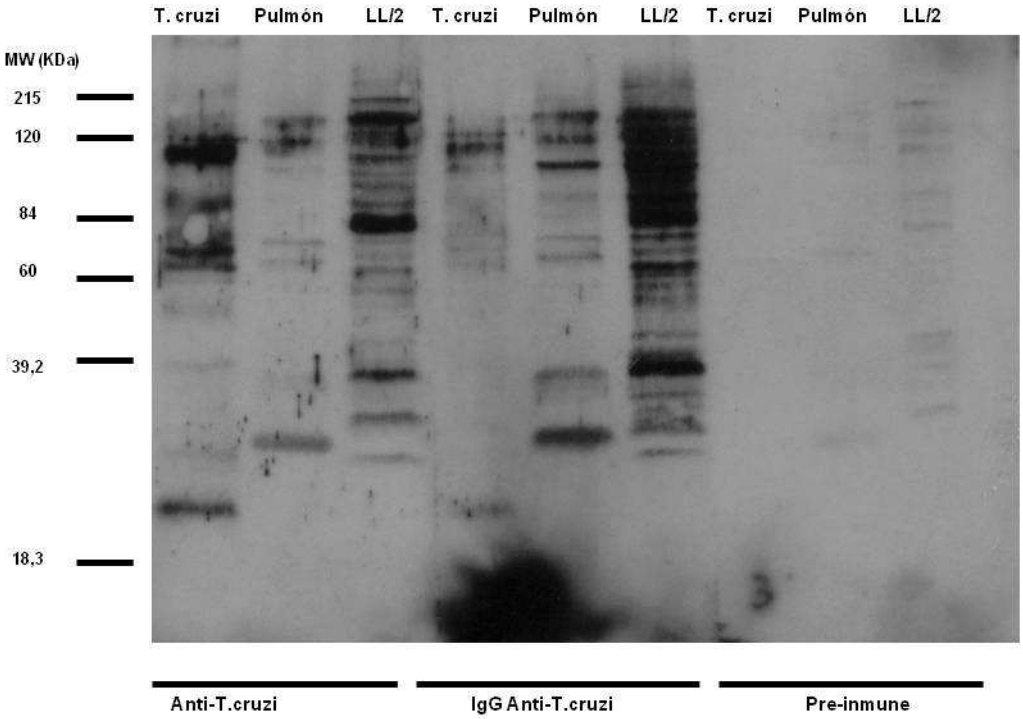


Figura 10 Western Blot realizado sobre extractos de LL/2, pulmón normal y *T. cruzi* empleando sueros policlonales generados contra *T. cruzi*, así como el suero pre-inmune y los anticuerpos purificados policlonales con reactividad frente a *T. cruzi*

Adicionalmente se evaluó la reactividad de los anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* purificados, con el fin de utilizarlos posteriormente para la purificación de las proteínas reconocidas mediante cromatografía de afinidad.

Como se observa en la figura 10, se evidenció reactividad cruzada entre el suero policlonal con ambos extractos celulares. Interesantemente el patrón de bandas obtenido es diferente, y no está presente en las muestras que se incubaron con el suero pre-inmune. Se observa en la figura que la reactividad de los mismos es más pronunciada principalmente para el carril correspondiente a LL/2. Entre las proteínas sujetas a reactividad cruzada con LL/2 pueden observarse bandas correspondientes a proteínas entre 120 y 60 kDa, destacándose una banda de 84kDa, así como proteínas con pesos menores a 40kDa. Por otra parte, dentro de las proteínas de muestras de pulmón normal reconocidas, se destacan componentes de alrededor de 120kDa así como de pesos

moleculares menores entre 40 y 20kDa. Complementariamente, se evaluó la reactividad de los anticuerpos IgG anti- *T. cruzi* purificados según se describió anteriormente, donde se aprecia que la señal observada es más fuerte utilizando la misma dilución de anticuerpos, para el extracto de pulmón normal, pero principalmente para la línea LL/2.

Electroforesis bidimensional y Western Blot

A los efectos de identificar las proteínas tumorales sujetas a reactividad cruzada con antígenos de *T. cruzi*, las proteínas de las línea celular LL/2 y de pulmón normal fueron separadas mediante electroforesis bidimensional. Se realizaron dos geles en simultáneo para cada extracto. Uno de ellos fue teñido con Coomasie Blue coloidal, mientras que el otro fue empleado para realizar un Western Blot con suero anti-*T. cruzi* de conejo según se indicó en materiales y métodos. Se observa en la figura 11 y 12 los geles obtenidos así como los western-blot correspondientes.

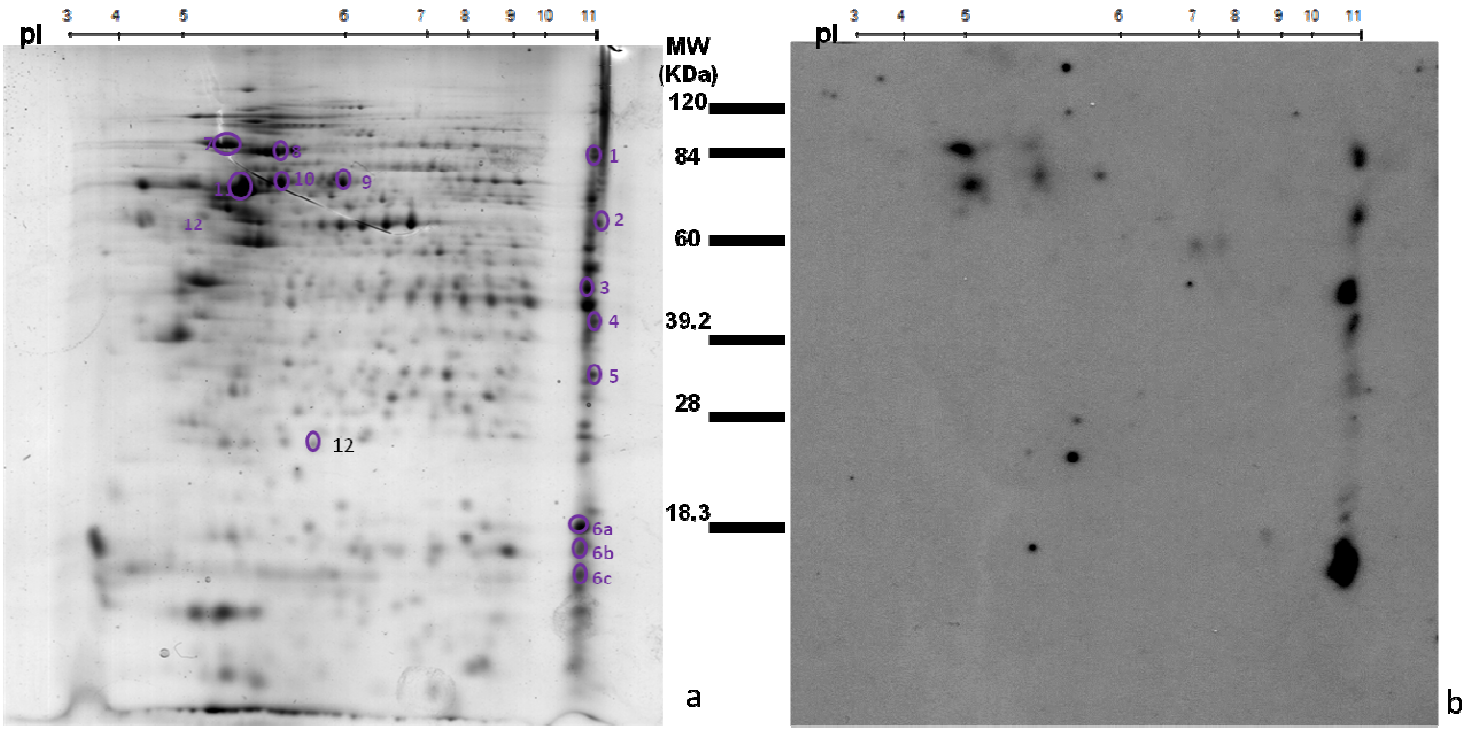


Figura 11. Electroforesis bidimensional y Western Blot sobre la línea LL/2. A. gel teñido con Coomasie blue, los círculos numerados corresponden a las proteínas analizadas por espectrometría de masa. B. Western-blot con suero anti-*T. cruzi* donde se observan las proteínas sujetas a reactividad cruzada.

En cuanto a LL/2, cabe destacar que se detectaron spots de pesos moleculares similares a las bandas observadas en el western monodimensional, como lo son los spots de pesos moleculares entre 84 y 60kDa, particularmente los de 84kDa que corresponderían entonces a la banda más intensa observada en la figura 10.

Asimismo, en las muestras de pulmón normal que se muestran en la figura 12, se verificó nuevamente que el suero generado reacciona con este extracto, y como se indicó para LL/2, los pesos moleculares de los spots detectados por western blot se corresponden con los de la figura 10 de western blot monodimensional. Cabe destacar además, que el patrón de spots observados para cada extracto es diferente, indicando reactividad diferencial entre tejido normal y células tumorales.

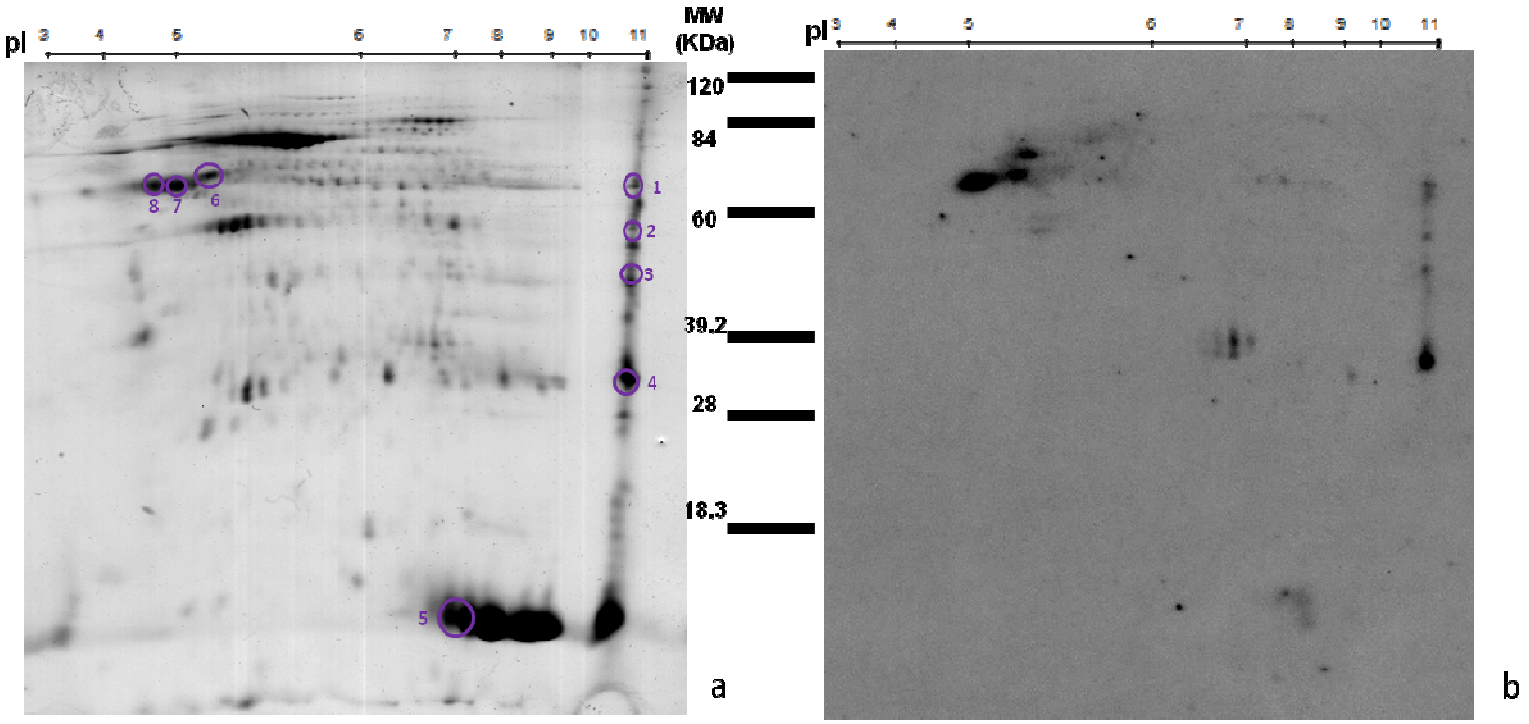


Figura 12. Electroforesis bidimensional y Western Blot sobre extracto proteico de pulmón normal de ratón. a. gel teñido con coomasie blue coloidal, y los círculos numerados corresponden a las proteínas analizadas por espectrometría de masa. B. Western-blot con suero anti-*T. cruzi* donde se observan las proteínas sujetas a reactividad cruzada.

En ambos casos, las membranas fueron "strippeadas", para eliminar los inmunocomplejos formados para luego realizar un western-blot utilizando como anticuerpo primario suero pre-inmune, el cual fue utilizado como control negativo. En no se observaron spots que coincidieran con los obtenidos al incubar con el suero anti-T. *cruzi*, indicando que la reactividad es específica de anticuerpos producidos mediante la inmunización con el extracto proteico de *T. cruzi.*

Los spots presentes en el western Blot fueron identificados por superposición en el gel teñido con Coomasie blue coloidal para luego ser escindidos del mismo. Las proteínas fueron digeridas con tripsina y los péptidos extraídos del gel, concentrados y analizados por espectrometría de masa como se describió en materiales y métodos. Se muestra en la figura 11 y 12 a, los spots analizados con un círculo y una referencia numérica. La identidad de las proteínas obtenidas se determinó mediante búsqueda en la versión on-line del programa MASCOT, a partir de las masas de los péptidos y los iones provenientes de fragmentaciones de los picos de mayor intensidad en los espectros obtenidos en modo reflector. Se muestra en la figura 13 a modo de ejemplo el espectro obtenido para la proteína de LL/2 6b, identificada como peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A.

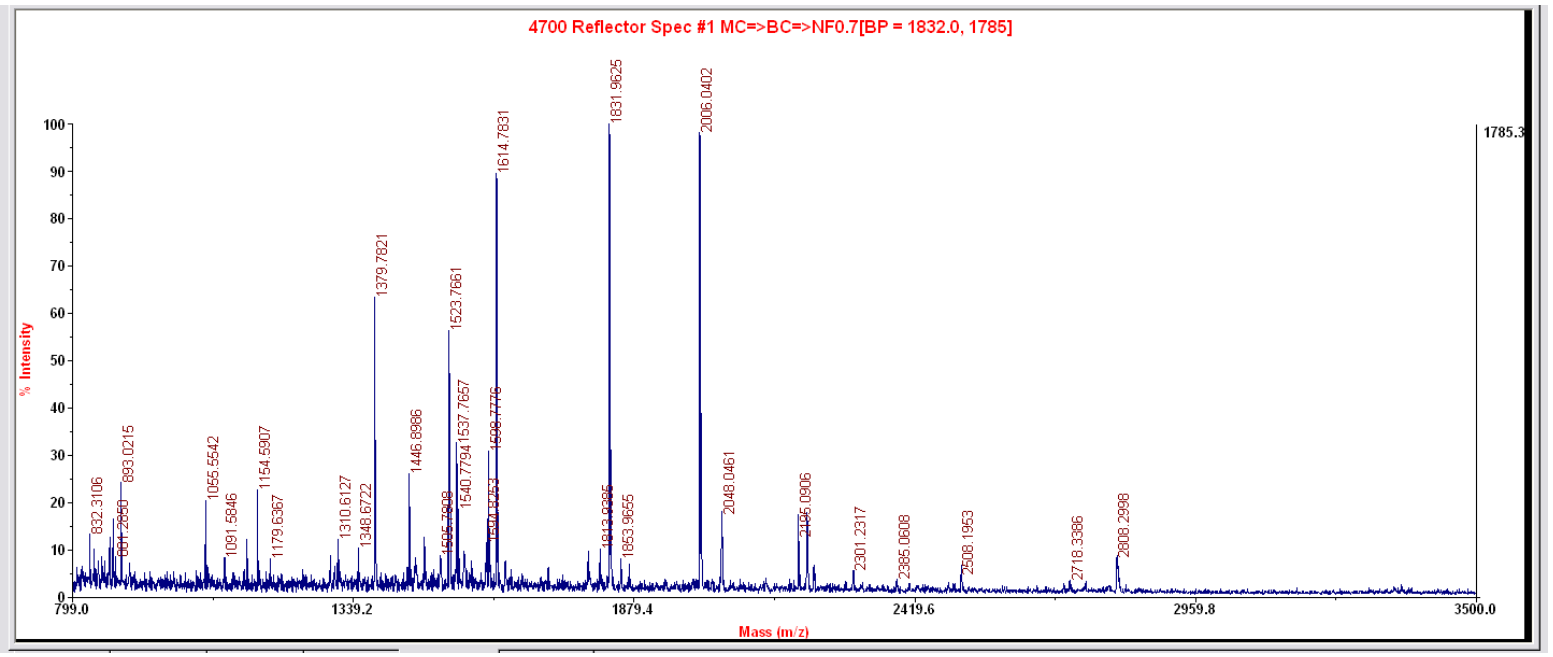


Figura 13 Espectro de masa obtenido en modo reflector positivo para la muestra de LL/2 6b identificada como peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A .

Tabla 2 Proteínas identificadas por espectrometría de masa que presentan reactividad cruzada entre LL/2 y *T. cruzi*

Rótulo de la muestra	Masa mol. en gel kDa.	Proteína identificada por Espectrometría de Masa	Masa mol. Teórica kDa.
3	45	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3-like [Mus musculus]	39
3´	45	heterogenous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 [Mus musculus] glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Mus musculus]	36 36
4	40	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 isoform b [Mus musculus]	34
5	35	proteasome subunit alpha type-7 [Mus musculus]	28
6a	18,3	cofilin-1 [Mus musculus]	18,5
6b	17	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A [Mus musculus]	18
7	84	BiP [Mus musculus]	72
8a	84	unnamed protein product [Mus musculus]	68
8b	84	unnamed protein product [Mus musculus]	70
9	70	unnamed protein product [Mus musculus]	55
10	65	Hspd1 protein [Mus musculus]	59
11	70	unnamed protein product [Mus musculus]	53,6

De esta forma, se identificaron 9 proteínas en LL/2 que estarían sujetas a reactividad cruzada con antígenos compartidos de *T. cruzi. A*dicionalmente, cuatro de las muestras fueron identificadas como componentes o fragmentos de proteínas no identificadas, mientras que las cuatro muestras restantes no pudieron ser identificadas dado que no se obtuvieron datos estadísticamente significativos sobre su identidad. Se detalla en la tabla 2 las proteínas identificadas en LL/2.

En cuanto a los spots analizados por espectrometría de masa correspondientes a pulmón normal, se pudieron identificar únicamente dos spots, los que correspondieron a la proteína beta-globina las que se muestran en la tabla 3.Por otra parte se obtuvo una muestra que corresponde a una proteína no identificada, mientras que el resto de las muestras no se pudo identificar.

Tabla 3 Proteínas identificadas por espectrometría de masa que presentan reactividad cruzada entre muestra de pulmón normal y *T. cruzi*

Rótulo de la muestra	Masa mol. En gel kDa.	Proteína identificada por Espectrometría de Masa	Masa mol. Teórica kDa.
5a	15	beta-globin [Mus musculus]	16
5b	15	beta-globin [Mus musculus] Alpha-globin	16 15
6	65	unnamed protein product	53,6

Purificación de antígenos tumorales

Con el fin de purificar los antígenos presentes en la línea tumoral LL/2 reconocidos por anticuerpos anti-*T. cruzi,* se armó una columna con los anticuerpos policlonales anti-*T. cruzi* purificados anteriormente. Mediante cromatografía de afinidad entonces, un extracto proteico de LL/2 se incubó durante toda la noche y luego se recuperó la fracción de antígenos tumorales que eluyeron a pH básico. Se evaluó el contenido proteico de estos eluídos midiendo la densidad óptica a 280nm, y se muestra en la figura 14 el cromatograma obtenido donde se aprecia un pico entre las fracciones 2 y 5. Dado que los niveles de absorbancia fueron bajos, se hizo un pool con los mismos y se precipitaron las proteínas con el fin de obtener una muestra de mayor concentración proteica, por el método descrito en materiales y métodos utilizando TCA/Acetona.

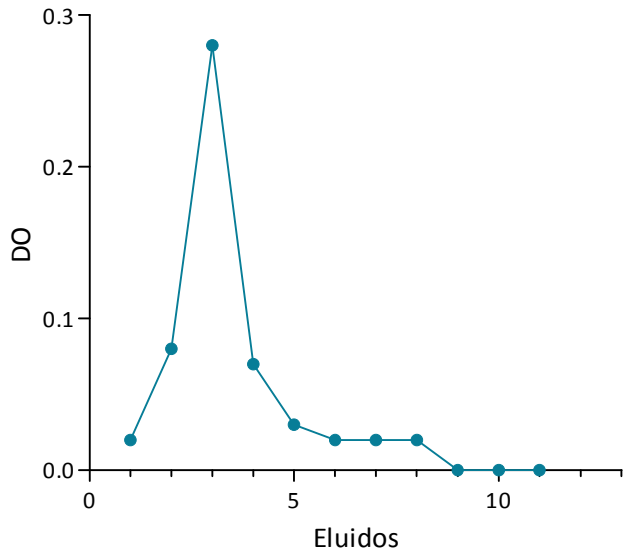


Figura 14 Purificación de antígenos tumorales de LL/2 sujetos a reactividad cruzada con *T. cruzi.* Se grafica densidad óptica medida a 280nm en función de los eluídos

Las proteínas purificadas y precipitadas fueron diluidas en buffer de lisis empleado para electroforesis bidimensional y se cuantificó por el método de Bradford. De esta forma, se emplearon 6mg de extracto celular y se obtuvo una alícuota conteniendo 50µg. Considerando esto, se evidencia que el rendimiento de la purificación fue bajo. Dada la cantidad de proteína purificada, no se evaluó la pureza de los mismos pudiendo incluir la muestra fragmentos de inmunoglobulinas que se desprendieran de la columna. Se realizó una separación por electroforesis bidimensional, utilizando tiras de gradiente 3-

11 no lineal, de forma análoga a la realizada para extractos proteicos totales, el gel se muestra en la figura 15.

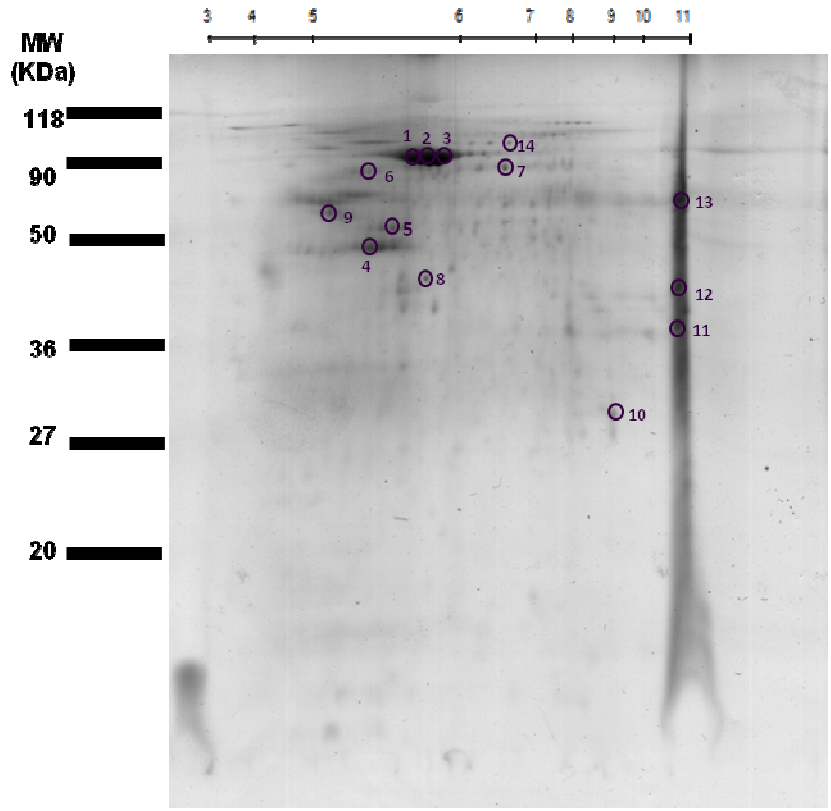


Figura 15 Electroforesis bidimensional de antígenos tumorales de LL/2 purificados por cromatografía de afinidad, tinción con Coomasie Blue Coloidal.

Cabe destacar que los spots que presentan mayor intensidad presentan pesos moleculares por debajo de 90kDa, los que podrían corresponder a las proteínas observadas por western blot mono y bidimensional con peso de aproximadamente 84kDa siendo su punto isoeléctrico similar, identificada como Bip por espectrometría de masa. Asimismo, los spots 11, 12 y 13 presentan asimismo las masas y punto isoeléctrico análogos a los spots 4, 3 y 2 respectivamente. Los spots escindidos y analizados se muestran en la figura 15. Sin embargo, las masas obtenidas de los espectros no facilitaron información respecto a la identidad de las proteínas, no obteniéndose proteínas identificadas de forma estadísticamente significativas con la herramienta MASCOT.

Discusión

Reactividad cruzada LL/2 T. cruzi

En primer lugar, a partir de los resultados obtenidos mediante ELISA, se deduce que los sueros anti-*T. cruzi* son capaces de reconocer antígenos de dicho parásito, confirmando así el buen funcionamiento de los anticuerpos a utilizar en el presente trabajo.

Mediante Western Blot pudo evidenciarse la existencia de reactividad cruzada entre proteínas de LL/2 y el suero policlonal de conejo generado contra antígenos de *T. cruzi.* De forma consistente, el suero pre-inmune del mismo animal no mostró reactividad, mostrando así que los antígenos presentes en el extracto de *T. cruzi* generaron los anticuerpos con capacidad de interaccionar con proteínas tumorales. Cabe destacar que se observó reactividad asimismo en proteínas de pulmón de ratones sanos. Sin embargo, el patrón de bandas observado fue claramente distinto y la intensidad de las mismas menor, por tanto el suero generado tendría la capacidad de reconocer preferencialmente a la línea tumoral LL/2. Asimismo, la presencia de bandas en la muestra correspondiente a pulmón normal y no en LL/2 podría corresponder a proteínas que en el fenotipo maligno reducen su expresión o presenta mutaciones haciendo que no se evidencie reconocimiento.

El análisis proteómico de la línea LL/2 permitió identificar 9 proteínas que participarían en la reactividad cruzada con *T. cruzi*. Interesantemente, todas menos Bip son proteínas intracelulares, y 7 de éstas han sido relacionadas a la malignización celular.

Entre las proteínas identificadas se encuentra peptidil-prolil-cis-trans-isomerasa A o Pin-1 la cual es una enzima que tiene la capacidad de isomerizar enlaces de tipo Ser/Thr precedidos por una prolina después de su fosforilación, regulando así cambios conformacionales que median mecanismos de señalización celular (Lee *et al* 2011). Se ha demostrado que estos cambios conformacionales en los sustratos de dicha enzima pueden modular la actividad catalítica, el estado de fosforliación, interacciones proteína-proteína, la localización subcelular, estabilidad proteica así como participar en procesos de diferenciación y proliferación celular (Ryo *et al,* 2003). La sobreexpresión de Pin 1 fue

descrita en los principales tipos de tumores como próstata, mama, cervical, de pulmón y colon, sin embargo existen excepciones como en cáncer renal (Bao *et al,* 2004). Esta desregulación en Pin-1 presente en células tumorales, tiene la capacidad de activar oncogenes o inactivar genes supresores de tumores así como inhibidores de crecimiento. Interesantemente, esta proteína está relacionada con procesos de activación de los factores Ras/C-jun, las vías wint/β-catenina y NF-kβ los cuales han sido relacionados en oncogénesis y malignidad celular (Ryo *et al,* 2005). Asimismo, Pin-1 ha sido estudiada como blanco molecular en cáncer de próstata, donde la inhibición de la misma con ARN interferente generó la supresión del crecimiento celular y del fenotipo tumoral, mostrando así el posible valor terapéutico de dicho marcador tumoral (Ryo *et al,* 2005).

Otro grupo de proteínas identificadas en este trabajo, son las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNPs) de las cuales fueron caracterizadas A1, A2/B1 y A3. Este grupo de proteínas tiene un rol central en el metabolismo del ARN, desde su empaquetamiento, splicing alternativo, exportación al citoplasma así como en la regulación de su estabilidad y traducción (He *et al, 2005*). Más de 20 hnRNPs han sido caracterizadas, todas presentan un motivo de reconocimiento al ARN (RRM) siendo las más abundantes hnRNP A1, A2/B1 y A3, las que comparten un alto grado de homología de secuencia (Boukakis *et al,* 2010).

La proteína hnRNP A2/B1 ha sido ampliamente documentada como marcador tumoral en cáncer de pulmón humano (Sueoka *et al*, 2001). Se describió su sobre-expresión en el epitelio bronquial transformado, correlacionándose con la fase crítica de cáncer de pulmón (Zhou *et al*, 2001). Por otra parte hnRNP A1 también muestra un aumento en su expresión en algunos canceres incluyendo oligodendrogliomas. (He *et al* 2005). Adicionalmente, estas proteínas tienen potencial como blancos en terapia, a partir de trabajos que mostraron que células tumorales con niveles disminuidos de hnRNPs A1 y A2 mueren por apoptosis (Patry *et al,* 2003). Finalmente, hnRNPs A3, menos estudiada muestra alta homología con A1 y A2, sin embargo no hay consenso en el rol de esta proteína en células tumorales, mostrando algunos trabajos que su expresión se mantiene constante y no es esencial para la proliferación y sobrevida celular (He *et al 2005*).

Cofilin-1, otra de las proteínas identificadas, es una de las principales responsables en procesos de migración celular, participando en la dinámica de los filamentos de actina y adicionalmente en el fenotipo metastásico celular. Forma parte de la vía de cofilina, compuesta por quinasas y fosfatasas que regulan a cofilin-1 que coordinadamente inician la polimerización de la actina y por tanto la motilidad celular en respuesta a estímulos en el microambiente (Wang *et al* 2007, Muller *et al,* 2011). Se ha descrito que Cofilin-1 está sobre-expresada en líneas celulares de glioblastoma invasivos de rata, células de líneas celulares de pulmón A549 y cáncer pancreático. La sobre-expresión espontánea de cofilin-1 puede ser detectada en sub-poblaciones invasivas de células de cáncer de mama así como en biopsias de carcinoma ovario, renal y oral (Wang *et al* 2007).

Como se muestra en la tabla 2, otra de las proteínas identificadas fue la subunidad alfa tipo 7 del proteasoma, también denominada subunidad C. Se ha descrito que varios tipos de células malignas proliferantes son más susceptibles al bloqueo del proteasoma respecto a las no tumorales. Esta característica estaría relacionada con un aumento en la actividad del proteasoma que contribuye a la oncogénesis, particularmente protegiendo a las células mediante una eliminación eficiente de proteínas irregulares o dañadas. Es entonces esta proteína un posible blanco para terapia, dada la observación que inhibidores del proteasoma son citotóxicos para células tumorales, mientras que en algunas tipos de células quiescentes o diferenciadas, son citoprotectores (Almond *et al,* 2005).

Las dos últimas proteínas relacionadas a cáncer que fueron identificadas, son las chaperonas HSPD1 y Bip.

La proteína HSPD1 también denominada HSP60 (Heat shock 60kDa protein 1) pertenece a una familia de chaperonas localizada principalmente en la matriz mitocondrial y en la membrana externa de dicho organelo. Menos frecuentemente puede encontrarse también en compartimentos extra-mitocondriales. Así como las proteínas antes mencionadas, se ha observado sobre-expresión de HSP60 en ciertos tipos de cáncer. Se ha postulado el uso de esta proteína como marcador del estadio clínico y la prognosis de pacientes en una variedad de tumores y lesiones pre-tumorales como en el

tumor adrenal de Cushing, de mama, carcinoma ductal, bronquial, exo-cervical así como en próstata (Czarnecka *et al*, 2006).

Finalmente, Bip (Immunoglobulin heavy-chain Binding protein), o GRP78 pertenece a la familia de chaperonas HSP70 y se localiza principalmente en el retículo endoplasmático (RE). Entre sus funciones se encuentra la capacidad de unir calcio y regular la señalización de estrés en el RE (Lee 2007, Dong *et al*, 2008). Esta proteína es esencial durante el desarrollo embrionario, como chaperona previene la formación de proteínas con errores en su plegamiento y participa además en la homeóstasis del calcio en el RE (Lee 2007). Cabe destacar que Bip está presente en la membrana del RE puede inhibir directamente efectores pro-apoptóticos como la caspasa- 7, contribuyendo de esta manera a la sobrevida tumoral. Por otra parte, la expresión de niveles elevados de Bip está correlacionado con la patología, recurrencia y peor sobrevida de pacientes en cáncer de próstata, pulmón, mama, colon y gástrico. Adicionalmente, en líneas celulares tumorales, Bip promueve la sobrevida y quimioresistencia tanto en células tumorales proliferantes o quiescentes y ha sido implicada en proliferación e invasión a través de la activación de las vías Akt y PAK2 (Dong *et al*, 2008). Interesantemente, se ha descrito que esta proteína puede encontrarse además en la superficie celular de células tumorales, no así en células normales, abriendo la posibilidad de utilizarla como blanco terapéutico, dada la importancia además de esta proteína en la sobrevida de células tumorales.

De hecho, la reactividad cruzada entre *T. cruz*i y las proteínas de LL/2 Bip, hnRNP A2/B1, hnRNP A3, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase y la subunidad alfa del proteasoma fue descrita de forma preliminar anteriormente (Monin 20011), cabe destacar que en ese caso, el suero y el protocolo para obtener los geles bidimensionales fueron diferentes a los utilizados en el presente trabajo, confirmando entonces los resultados aquí presentados.

Asimismo, se identificaron cuatro proteínas de función no descrita, las cuales corresponden a antígenos tumorales que pueden tener un rol en la interacción entre cáncer y parásitos aún desconocida. Se cuenta con la secuencia peptídica de las mismas, lo que permiá su posterior estudio para elucidar el rol de las mismas en este proceso.

En cuanto a las proteínas identificadas en la muestra de pulmón normal, cabe destacar que no corresponden a proteínas identificadas en muestras tumorales. Esto puede

deberse como se comentó anteriormente a proteínas que modifican su expresión en células tumorales o modifican su antigenicidad. En el caso de las proteínas detalladas en la tabla 3, puede considerarse la globina identificada como fracciones de glóbulos rojos que pudieran estar formando parte de la muestra de pulmón.

En conjunto, estos resultados abren interesantes perspectivas en cuanto al uso de estas proteínas o de los anticuerpos generados tanto para diagnóstico como para terapia anti-tumoral. Para ello, sería necesario identificar las proteínas de *T. cruzi* que presentan los epítopes compartidos con las proteínas identificadas. Para lo cual, sería importante realizar una búsqueda bioinformática en base de datos para determinar si las proteínas identificadas se expresan en la cepa de *T. cruzi* utilizada, si hay homología con otras proteínas o si se trata de epítopes compartidos. De hecho, se identificaron adicionalmente cuatro proteínas de función desconocida en la bibliografía y se cuenta con la secuencia correspondiente. Sería interesante comprobar si la cepa *de T. cruzi* empleada en este trabajo, presenta proteínas con homología a las mismas, puesto que se trataría nuevos antígenos tumorales aún no descritos, que no están presentes en la línea celular normal.

La identificación de estos epítopes en *T. cruzi* permitiría entonces el desarrollo de nuevos protocolos de inmunización utilizando fracciones parasitarias o de proteínas purificadas y la posterior evaluación de la respuesta anti-tumoral. Evitando así el uso de extractos proteicos totales los cuales tienen composición variable y avanzando de esta forma en el desarrollo de una vacuna antitumoral basada en péptidos parasitarios.

Purificación de antígenos tumorales.

Con el fin de purificar los antígenos tumorales que presentaran reactividad cruzada con anticuerpos anti-*T. cruzi* se armó una columna de cromatografía de afinidad. Cabe destacar que la purificación de anticuerpos policlonales de *T. cruzi* se realizó a partir de IgGs totales, por tanto, perdiendo la fracción de inmunoglobulinas de subtipo IgM. Teniendo en cuenta que varios antígenos tumorales descritos en la literatura compartidos con parásitos corresponden a estructuras de O-glicosilación incompleta, este isotipo de inmunoglobulinas podría participar en el reconocimiento de dichas estructuras. Sin

embargo, al evaluar los anticuerpos purificados de *T. cruzi* respecto al suero total sobre proteínas parasitarias, así como de LL/2 y de pulmón normal, se verificó que el reconocimiento presentó igual patrón de bandas identificado pero mayor intensidad a la misma dilución. Por tanto podemos concluir que los anticuerpos purificados presentaron la misma actividad inmunológica frente a proteínas tumorales aunque no presentaran la fracción de IgMs.

Teniendo en cuenta que los antígenos que presentan reactividad cruzada con *T. cruzi* detectados mediante Western-Blot pueden ser minoritarios debido a la alta sensibilidad de dicho ensayo, se procedió a la purificación de los mismos. De esta forma, pudiendo confirmar la identidad de las proteínas purificadas y disponer además de muestras enriquecidas en los antígenos de interés para profundizar en su caracterización.

En cuanto a la cromatografía de afinidad, se evidenció un rendimiento bajo de purificación, lo que podría estar relacionado con la capacidad de la columna generada así como el tratamiento de la muestra luego de las eluciones, en la precipitación de la muestra. Para optimizar esta técnica, podría utilizarse una columna de mayor capacidad, es decir ligar más inmunoglobulinas IgG anti-*T. cruzi* a la sefarosa, lo que está condicionado a la purificación de los mismos desde el suero de conejo. Asimismo, para mejorar la precipitación y el concentrado del material eluído sería interesante evaluar el uso de kits comerciales como el clean-up kit de GE.

Los antígenos purificados entonces por cromatografía fueron separados por electroforesis bidimensional. De forma interesante el patrón de spots observado podría correlacionarse con los spots obtenidos por Western Blot del extracto total de LL/2. Dado que no fue posible la identificación por espectrometría de masa de los mismos, actualmente se está repitiendo la purificación utilizando una mayor cantidad de extracto proteico de la línea tumoral, para contar con una mayor cantidad de material eluído y así además de confirmar la identidad de las proteínas purificadas, disponer de material para profundizar en la caracterización de los mismos.

Sería interesante evaluar el perfil de glicosilación de las proteínas purificadas a partir de la observación que el efecto terapéutico así como profiláctico se pierde en ratones que fueron sujetos a inmunización con células de LL/2 cuando el extracto de *T. cruzi* es deglicosilado lo que indicaría que antígenos glicanos estarían implicados en dicha protección (Monin, 2011). Para determinar si parte de los anticuerpos producidos están

dirigidos contra estas estructuras y son las reconocidas en las proteínas identificadas, varias estrategias pueden utilizarse. Entre ellas se encuentra la transferencia de los antígenos tumorales purificados luego de ser separados por electroforesis bidimensional a membranas y realizar Blots con lectinas biotinilados las que presentan afinidad por diferentes motivos glucídicos como pueden ser los antígenos T, Tn, sialil-Tn entre otros. La dificultad que presenta esta técnica es el requerimiento de grandes cantidades de proteína purificada para realizar las electroforesis bidimensionales y los Western- Blot correspondientes.

Otra estrategia podría estar basada en la purificación de glicoproteínas por cromatografía en columnas con lectinas inmovilizadas. De esta forma, se puede evaluar la reactividad de las glicoproteínas purificadas con el suero policlonal anti-*T. cruzi*, y su posterior identificación por espectrometría de masa.

Finalmente, otra aproximación para el estudio de la glicosilación de proteínas sujetas a reactividad cruzada con antígenos de *T. cruzi* podría consistir en la separación en geles bidimensionales de las proteínas tumorales y mediante el uso de kits comerciales que son compatibles con espectrometría de masa, la identificación de O-proteínas del gel., los que luego podrían ser correlacionados con los sptos de Western Blot.

Conclusiones

En este trabajo fue posible confirmar la reactividad cruzada entre extractos proteicos de la línea de cáncer de pulmón murino LL/2 y anticuerpos generados contra antígenos del parásito *T. cruzi*. Asimismo, se observó que el reconocimiento es preferencial por esta línea celular respecto a muestras de pulmón de ratones sanos, siendo el patrón de proteínas observado distinto.

Se identificaron varias proteínas tumorales sujetas a reactividad cruzada, las cuales han sido implicadas en trabajos previos en el proceso de transformación maligna, su posible uso como blancos terapéuticos así como marcadores de diagnóstico, así como proteínas aún no descritas que podrían corresponder a nuevos antígenos tumorales.

Finalmente, se optimizaron técnicas para la purificación de las proteínas sujetas a reactividad cruzada lo que permitirá confirmar la identidad de las proteínas y continuar con la caracterización molecular de las mismas.

Globalmente, los resultados presentados en este trabajo abren interesantes perspectivas en la identificación y caracterización de antígenos tumorales, así como generar mayor información respecto a interacciones entre cáncer y parásitos, los que pueden llevar al desarrollo de nuevas estrategias de terapia anti-tumoral.

Referencias Bibliográficas

Akgül, H., Tez, M., Ünal, A. E., Keskek, M., Sayek, I. & Özçelik, T. (2003). Echinococcus against Cancer: Why Not?,. *Cancer* 98: 1998-1999.

Almond, J. B., Cohen, G. M. (2002). The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 16(4): 433-443.

Alvarez Errico, D., Medeiros, A., Míguez, 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. *Experimental Parasitology* 98: 100-109.

Bao, L., Kimzey, A., Sauter, G., Sowadski, J. M., Lu, K. P., Wang, D. (2004). Prevalent Overexpression of Prolyl Isomerase Pin1 in Human Cancers. *The American Journal of Pathology* 164(5): 1727-1737.

Berwick, M., Vineis, P. (2000). Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review

Journal of the National Cancer Institute 92(18): 1537.

Bonifaz, L. C., Bonnyay, D. P., Charalambous, A., Darguste, D.I., Fujii, S., Soares, H., Brimnes, M.K., Moltedo, B., Moran, T.M., Steinman, R.M. (1996). In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *Journal of Experimental Medicine* 199(6): 815-824.

Boukakis, G., M. Patrinou-Georgoula, M. Lekarakou, C. Valavanis &A. Guialis (2010). Deregulated expression of hnRNP A/B proteins in human non-small cell lung cancer: parallel assessment of protein and mRNA levels in paired tumour/non-tumour tissues. *BMC Cancer* 10(1): 434.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical biochemistry* 72(1-2): 248-254.

Brekke, O., Sandlie, I. (2003). Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nature Reviews Cancer Drug Discovery* 2: 52-62.

Brockhausen, I. (2006). Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO reports* 7(6): 599-604.

Buscaglia, C., Campo, V., Frasch, A., Di Noia, J. (2006). Trypanosoma cruzi surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nature Reviews Microbiology* 4: 229-236.

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 UDPGalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase activity. *journal of Parasitology* 89(4): 709-714.

Casaravilla, C., Malgor, R., Carmona, C., Characterization of carbohydrates of adult Echinococcus granulosus by lectin-binding analysis. (2003a). Characterization of carbohydrates of adult Echinococcus granulosus by lectin-binding analysis. *Journal of Parasitology* 89(1): 57-61.

Comisión Honoraria de Lucha Contra el cáncer (2008) Informe anual

Conrad, D., Goyette, J., Thomas, P. (2008). Proteomics as a Method for Early Detection of Cancer: A Review of Proteomics, Exhaled Breath Condensate, and Lung Cancer Screening. *Journal of General Internal Medicine* 23(0): 78-84.

Czarnecka, A. M., C. Campanella, G. Zummo &F. Cappello (2006). Mitochondrial chaperones in cancer: From molecular biology to clinical diagnostics. *Cancer Biology & Therapy* 5(7): 714-720.

Damerval C., D. D., Zivy M., Thiellement H. (1986). Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling protein. *Electrophoresis* 7: 53-54.

DePinho, R. A. (2000). The age of cancer. *Nature Reviews Cancer* 408: 248-254.

Díaz, A., Fontana, E.C., Todeschini, A.R., Soulé, S., González, H., Casaravilla, C., Portela, M., Mohana-Borges, R., Mendonça-Previato, L., Previato, J.O., Ferreira, F. (2009).

The major surface carbohydrates of the Echinococcus granulosus cyst: mucin-type O-glycans decorated by novel galactose-based structures. *Biochemistry* 48(49): 11678.

Dong, D., M. Ni, J. Li, S. Xiong, W. Ye, J. J. Virrey, C. Mao, R. Ye, M. Wang, L. Pen, L. Dubeau, S. Groshen, F. M. Hofman &A. S. Lee (2008). Critical Role of the Stress Chaperone GRP78/BiP in Tumor Proliferation, Survival, and Tumor Angiogenesis in Transgene-Induced Mammary Tumor Development. *Cancer Research* 68(2): 498-505.

Drake, C. G., Jaffee, E. & Pardoll, D. M. (2006). Mechanisms of immune evasion by tumors. *Advances in Immunology* 90: 51-81.

Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology* 3: 991-998.

Dunn, G. P., Old, L. J. Schreiber, R. D (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. . *Immunity* 21: 137-148.

Dunn, G. P., Old, L.J., Schreiber, R.D (2004 b). The three Es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology* 22: 329-360.

Freire, T., Casaravilla, C., Carmona, C. & Osinaga, E. (2003a). Mucin type Oglycosylation in Fasciola hepatica: characterization of carcinoma associated Tn and sialyl-Tn antigens and evaluation of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase activity. *International Journal for Parasitology.* 33: 47-56.

Freire, T., Robello, C., Casaravilla, C., Alvarez Errico, D., Medeiros, A., Carmona, C. & Osinaga, E. (2002). Antígenos mucínicos de O-glicosilación simple: nuevas similitudes moleculares entre células cancerosas y parásitos,. *Actas de Fisiología* 8: 89-107.

Freire, T., Robello, C., Soulé, S., Ferreira, F. & Osinaga, E. (2003b). Sialyl-Tn antigen expression and O-linked GalNAc-Thr synthesis by Trypanosoma cruzi,. *Biochemical and biophysical research communications* 312: 1309-1316.

Gabrilovich, D., Ishida, T., Oyama, T., Ran, S., Kravtsov, V., Nadaf, S., Carbone, D.P. (1998). Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells

and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood.* 92(11): 4150-4166.

Garcia, S. B., Aranha, A.L., Garcia, F.R., Basile, F.V., Pinto, A.P., Oliveira, E.C., Zucoloto, S. (2003). A retrospective study of histopathological findings in 894 cases of megacolon: what is the relationship between megacolon and colonic cancer? . *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 45: 91-93.

GE Healthcare Bio-Sciences (2007) Affinity Chromatography, Principles and Methods

GE Healthcare biosciences (2004) 2-D Electrophoresis principles and methods.

Gilboa, E., S.K. Nair, and H.K. Lyerly (1998). Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccines. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 46(2): 82-87.

Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A., Kuby, J. (2003). Immunology. Nueva York, Editorial W. H. Freeman and Company.5ta Ed22: Cancer and the Immune System501-524

Gong, P., Zhang, J., Cao, L., Nan, Z., Li, Z, Yang, J., Fang, H., Jiao, H., Jiang, T., Su, L., Zhang, X. (2011). Identification and characterization of myeloma-associated antigens inTrichinella spiralis. *Experimental Parasitology* 127: 784-788.

Hakomori, S. (2002). Glycosylation defining cancer malignancy: New wine in an old bottle. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* 99(16): 10231-10233.

He, Y., M. A. Brown, J. A. Rothnagel, N. A. Saunders &R. Smith (2005). Roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A and B in cell proliferation. *Journal of Cell Science* 118(14): 3173-3183.

Horgan, R. P., Kenny, L. C. (2011). 'Omic' technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *The Obstetrician & Gynaecologist* 13(3): 189-195.

Hudelist G., K. W. J., Attems J., Czerwenka K., Müller R., Manavi M., Steger G.G., Kubista E., Zielinski C.C., Singer C.F. (2003). Her-2/neu-triggered intracellular tyrosine kinase activation: in vivo relevance of ligand-independent activation mechanisms and impact upon the efficacy of trastuzumab-based treatment. *British Journal of cancer* 89: 93-991.

Igney, F. H., Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer* 2: 277-288.

Kumar, V., Abbas A. K., Fausto, N. & Mitchell, R. (2007). Robbins Basic Pathology, Editorial Saunders.8va EdiciónCapítulo 6 Neoplasia173-224

Lauwaet, T., Oliveira, M., Mareel, M., Leroy A. (2000). Molecular mechanisms of invasión by cáncer cells, leukocytes and microorganisms. . *Microbes and Infection* 2: 923-031.

Leahy, M. F., Seymour, J.F., Hicks, R.J., Turner, J.H. (2006). Multicenter phase II clinical study of iodine-131-rituximab radioimmunotherapy in relapsed or refractory indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 24: 4418-4425.

Lee, A. S. (2007). GRP78 Induction in Cancer: Therapeutic and Prognostic Implications. *Cancer Research* 67(8): 3496-3499.

Lee, T. H., L. Pastorino &K. P. Lu (2011). Peptidyl-prolyl cis–trans isomerase Pin1 in ageing, cancer and Alzheimer disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 13: null-null.

Linley, A. J., Ahmad, M., Rees, R.C. (2011). Tumour-associated antigens: considerations for their use in tumour immunotherapy. *International Journal of Hematology* 93(3): 263-273.

Lodish, H., Berck A., Martudaira, P., Kaiser, C.A., Kneger, M., Scott, M.P., Zipursky, S.L., Darnell, J. (2003). Molecular cell biology. Nueva York, Editorial W.H. Freeman and Company.5ta EdiciónCapítulo 20: Cancer935-973

Maizels, R. M., Balic, A., Gomez-Escobar, N., Nair, M., Taylor, M. D., Allen, J.E. (2004). Helminth parasites-masters of regulatio. *Immunological Reviews* 201: 89-116.

Medeiros, A., Chiribao, M. L., Ubillos, L., Festari, M. F., Saldaña, J., Robello, C., Domínguez, L., Calvete, J. J. Osinaga, E. (2008). Mucin-type Oglycosylation in Mesocestoides vogae (syn. corti). *nternational Journal for Parasitology.* 3: 265-276.

Mel´nikov, V. G., Fierro Velasko, F. H., Dobrovinskaya, O.R. (2004). Suppression of growth and metastasizing of T-cell lymphoma in mice infected with american tripanosomiasis at different stages of experimental infection. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 137: 475-478.

Monin, L. (2011). Evaluación de respuestas inmunitarias anti-tumorales por antígenos de *Trypanosoma cruzi*. *Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, PEDECIBA*.

Müller, C., R. de Barros, M. Castro, F. Lopes, R. Meurer, A. Roehe, G. Mazzini, J. Ulbrich-kulczynski, F. Dal-Pizzol, M. Fernandes, J. Moreira, L. Xavier &F. Klamt (2011). Validation of cofilin-1 as a biomarker in non-small cell lung cancer: application of quantitative method in a retrospective cohort. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 137(9): 1309-1316.

Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. (2008). Janeway's Immunobiology. Nueva York, Editorial Garland Science.7ma Edición

National "Cancer Institute (2009) Proteomics and cancer http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/detection/proteomics#r1."

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): 615-624.

Oliveira, E. C., Leite, M. S. B., Miranda, J. A. R., Andrade, A. L. S. S., Garcia, S. B., Luquetti, A. O. Moreira, H. (2001). Chronic Trypanosoma cruzi infection associated with low incidence of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. *Carcinogenesis* 22(5): 737-740.

Osinaga, E. (2007). Expression of Cancer-associated Simple Mucin-type O-glycosylated Antigens in Parasites. *IUBMB Life* 59: 269-273.

Parkin, D. M. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *International Journal of Cancer* 118: 3030-3044.

Patry, C., Bouchard, L., Labrecque, P., Gendron, D., Lemieux, B., Toutant, J., Lapointe, E., Wellinger, R., Chabot, B. (2003). Small Interfering RNA-Mediated Reduction in Heterogeneous Nuclear Ribonucleoparticule A1/A2 Proteins Induces Apoptosis in Human Cancer Cells but not in Normal Mortal Cell Lines. *Cancer Research* 63(22): 7679-7688.

Pérez-Victoria, J. M., Di Pietro, A., Barron, D., Ravelo, A.G., Castanys, S. &F. Gamarro (2002). Multidrug resistance phenotype mediated by the P-glycoprotein-like transporter in Leishmania: a search for reversal agents. *Current Drug Targets* 4: 311-333.

Proudfoot, O., Apostolopoulos, V., Pietersz, G. A. (2007). Receptor-mediated delivery of antigens to dendritic cells: anticancer applications. *Molecular Pharmacology* 4(1): 58-72.

Rabinovich, G. A. G., D., Sotomayor, E.M. (2007). Immunosupressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annual Review of Immunology* 25: 267-296.

Romer, T., Leonhardt, H., Rothbauer, U., (2011). Engineering antibodies and proteins for molecular in vivo imaging. *Current Opinion in Biotechnology* 22: 1-6.

Ruiz, G., Moreno, M., López, M., Vega, M. (2006). Anticuerpos Monoclonales terapéuticos, Fundación Española para el Desarrollo de la Investigación en Genómica y Proteómica/Fundación General de la Universidad Autónoma de Madrid.

Ryo A., L. Y., Lu K., Wulf G. (2003). Prolyl isomerase Pin1: a catalyst for oncogenesis and a potential therapeutic target in cancer. *Journal of Cell Science* 116: 773-783.

Ryo A., U. H., Ishiguro H., Saitoh T., Yamaguchi A., Perrem K., Kubota Y., Lu K.P., Aoki I. (2005). Stable suppression of tumorigenicity by Pin1-targeted RNA interference in prostate cancer. *Clinica cancer research* 11(20): 7523-7531.

Schreiber, R. D., Old, L.J. Smyth, M.J. (2011). Cancer immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* 331: 1565-1570.

Sharkey, R. M. G., D. M (2006). Targeted Therapy of Cancer: New Prospects for antibodies and Immunoconjugates. *A Cancer Journal for Clinicians* 56(4): 226-243.

Singh, P. K. H., M. A. (2006). Cell surface-associated mucins in signal transduction. TRENDS in Cell Biology, Vol. 16, n°9, pp. 467-476 (2006). Cell surface-associated mucins in signal transduction. *Trends in Cell Biology* 16(9): 467-476.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid,. *Analytical Biochemistry* 150(1): 76-85.

Stevanovic, S. (2002). Identification of tumour-associated t-cell epitopes for vaccine development. *Nature Review Cancer* 2(7): 514-514.

Strebhardt, K., Ullrich, A. (2008). Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nature Review Cancer* 8(6): 473-480.

Sueoka, E., N. Sueoka, Y. Goto, S. Matsuyama, H. Nishimura, M. Sato, S. Fujimura, H. Chiba &H. Fujiki (2001). Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein B1 as Early Cancer Biomarker for Occult Cancer of Human Lungs and Bronchial Dysplasia. *Cancer Research* 61(5): 1896-1902.

Swann J., S. M. (2007). Immune surveillance of tumors. *The Journal of Clinical Investigation* 117: 1137-1146.

Tacken, P. J., De Vries, I.J., Torensma, R., Figdor, C.G. (2007). Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nature Reviews Immunology* 7(10): 790-802.

Thors, C., Jansson, B., Helin, H., Linder, E., (2006). Thomsen-Friedenreich oncofetal antigen in Schistosoma mansoni : localization and immunogenicity in experimental mouse infection. *Parasitology* 132(1): 73-81.

Tuma, R. S. (2011). Immunotherapies in clinical trials: do they demand different evaluation tools? . *Journal of the National Cancer Institute* 103(10): 780-781.

Ubillos, L., Medeiros, A., Cancela, M., Casaravilla, C., Saldaña, J., Domínguez, L., Carmona, C., Le Pendu, J., Osinaga, E. (2007). Characterization of the carcinoma-associated Tk antigen in helminth parasites. *Experimental Parasitology* 116(2): 129-136.

Ubillos, L., Medeiros, A., Chiribao, M. L., Festari, M. F., Mazal, D., Berriel, E., Rondán, M., Carriquiry, L., Carzoglio, J., Bollati, M., Robello, C. & Osinaga, E. (2008).

Inmunidad protectora contra cáncer de mama y de colon inducida por extractos de Trypanosoma cruzi,. *Congreso Uruguayo de Oncología*.

Van Kooyk, Y., Rabinovich, G. A. (2008). Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nature Immunology*, 9(8): 593-600.

Wang, W., R. Eddy &J. Condeelis (2007). The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis. *Nat Rev Cancer* 7(6): 429-440.

Weinberg, R. A. (2007). The biology of cancer. Nueva York,, Garland Science.1a Edición

Wiliam, E. P. (2008). Fundamental Immunology Editorial Lippincott Williams and Wilking.6ta Edicióncapítulo 45 Tumor immunology1490-1522

World Health organization (2001). International Agency for Research on Cancer IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Part B: Biological Agents. Lyon 35-45

Wright, M., Henkle, K. Mitchell, G. (1990). An immunogenic Mr 23,000 integral membrane protein of Schistosoma mansoni worms that closely resembles a human tumorassociated antigen. Journal of Immunology. *Journal of Immunology* 144: 3195-3200.

Wulfkuhle, J. D., Liotta, L. A., Petricoin, E. F. (2003). Proteomic applications for the early detection of cancer. *Nat Rev Cancer* 3(4): 267-275.

Yu, L. (2007). The oncofetal Thomsen-Friedenreich carbohydrate antigen in cancer progression. . *Glycoconjugate Journal* 24: 411-420.

Zambrano-Villa, S., Rosales-Borjas, D., Carrero, J.C., Ortiz-Ortiz, L. (2002). How protozoan parasites evade the immune response. *Trends in parasitology* 18(6): 272-278.

Zhou J., A. D. C., I Avis I., Martínez A., Vos M., Smith L., Treston A. M., . Mulshine J.L. (2001). Differential expression of the early lung cancer detection marker, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-A2/B1 (hnRNP-A2/B1) in normal breast and neoplastic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 66: 217-224.