

Identificación de Antígenos Involucrados en la Reactividad Cruzada entre *Echinococcus* *granulosus* y células CT26 y LL/2

Tesina de Fin de Carrera - Licenciatura en Bioquímica
Facultad de Ciencias
Universidad de la República

Sofía Russo Rossi

Tutor: Dr. Eduardo Osinaga

Laboratorio de Glicobiología e Inmunología Tumoral

Institut Pasteur de Montevideo

Contenido

Contenido	2
Resumen	4
Introducción y antecedentes	5
<i>Echinococcus granulosus</i> y la hidatidosis	5
Biología del cáncer	6
Inmunidad y cáncer	9
Antígenos tumorales	14
Inmunoterapia anti-tumoral	15
Relación entre células tumorales y parásitos	17
Objetivos	20
Objetivos específicos	20
Materiales y Métodos	21
Líneas celulares	21
Extractos celulares	21
Líquido hidatídico	22
Determinación de la concentración proteica	22
Producción de anticuerpos policlonales anti-Líquido Hidatídico	22
ELISA	23
Western Blot	24
Electroforesis bidimensional	25
Espectrometría de masa	27
Resultados	28
Producción de anticuerpos policlonales anti-líquido hidatídico	28
Western Blot monodimensional	29
Electroforesis Bidimensional	31

Identificación de Antígenos Involucrados en la Reactividad Cruzada entre *Echinococcus granulosus* y células CT26 y LL/2. Sofía Russo

Espectrometría de masa	34
Discusión.....	38
Referencias Bibliográficas	42

Resumen

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo occidental, precedido únicamente por las enfermedades cardiovasculares. Particularmente en Uruguay, la muerte por cáncer de pulmón es la de mayor incidencia entre las muertes oncológicas en hombres, mientras que en mujeres es el cáncer de mama el que presenta mayor mortalidad (Comisión de Lucha Honoraria Contra el Cáncer, 2008).

La alta incidencia del cáncer muestra la importancia que tiene el desarrollo de nuevas terapias anti-tumorales, como puede ser la inmunoterapia. El fin de la inmunoterapia en cáncer es desarrollar vacunas que puedan generar potentes respuestas inmunes anti-tumorales sin efectos secundarios. Ello puede ocurrir estimulando tanto la inmunidad innata como adaptativa y causando el reconocimiento de tumores con la subsecuente eliminación del mismo (Myc et al, 2011).

En los últimos años se ha observado que la infección por ciertos parásitos reduce la incidencia de cáncer. Un estudio epidemiológico determinó una relación inversa entre la incidencia de cáncer y la infección por el parásito *Echinococcus granulosus* (Akgül et al, 2003). Por otro lado, en este parásito se ha demostrado la presencia de antígenos asociados a tumor como el Tn, Sialil-Tn y TF.

Basados en estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue identificar antígenos involucrados en la reactividad cruzada entre *Echinococcus granulosus* y las células cancerosas murinas CT26 y LL/2. Logramos identificar la proteína Mortalin y la enzima Creatin-quinasa tipo M en la línea de cáncer de colon CT26 que presentan reactividad cruzada con antígenos de *E. granulosus*. Por otro lado, en la línea de cáncer de pulmón LL/2 identificamos la Enolasa 1 y la fosfoproteína inducida por estrés 1, las que presentan reactividad cruzada con antígenos de *E. granulosus*.

Introducción y antecedentes

Echinococcus granulosus y la hidatidosis

La hidatidosis es una de las enfermedades zoonóticas de mayor prevalencia en Argentina, Uruguay, Chile, Perú y el sur de Brasil (Larrieu, 2004). Esta enfermedad es producida por *Echinococcus granulosus* y es tratada mediante cirugía, teniendo especial cuidado de extraer el quiste intacto para que no se formen nuevos quistes y que no se produzca un shock anafiláctico (Eckert & Deplazes, 2004).

Echinococcus granulosus es un cestodo que parasita el intestino delgado de los cánidos (Canidae) en su forma adulta, y tiene importantes hospederos intermedios como bovinos, equinos, ovinos y los humanos, en donde causa la enfermedad de la hidatidosis (Del Brutto, 2005). *E. granulosus* requiere de dos hospederos, uno definitivo, en donde se encuentra la tenia en forma adulta, y hospederos intermediarios, los cuales sufren la enfermedad al desarrollarse la tenia en su forma larvaria. Los hospederos definitivos son principalmente los cánidos, en donde la tenia en forma adulta produce huevos que son excretados en las heces del animal (McManus et al, 2003). Cuando el hospedero intermedio ingiere las heces infectadas, los huevos eclosionan en su sistema digestivo, liberando las oncosferas, que a través de las vellosidades del intestino, pasan a la circulación sanguínea y linfática (McManus et al, 2003). De esta forma, alcanzan diferentes órganos donde se desarrollan quistes hidatídicos, principalmente en hígado y pulmones (Del Brutto, 2005). Estos quistes pueden crecer alcanzando tamaños realmente importantes. Algunos se desarrollan tanto que llegan a abrirse creando abscesos que invaden tanto los órganos del animal como su torrente sanguíneo (Eckert & Deplazes, 2004). Lo más común en estos casos es que el animal muera en pocas horas debido a shock anafiláctico. El ciclo biológico del parásito se cierra cuando los cánidos ingieren vísceras de animales infectados que contienen quistes hidatídicos. Cuando esto ocurre, los protoscolex contenidos en el quiste hidatídico son liberados al intestino del animal dando lugar al desarrollo de nuevas tenias (Figura 1)(McManus et al, 2003; Del Brutto, 2005). Simplemente cortando el

ciclo biológico a este nivel, no alimentando a los perros con vísceras crudas, se reduce significativamente la prevalencia de la hidatidosis (Eckert & Deplazes, 2004).

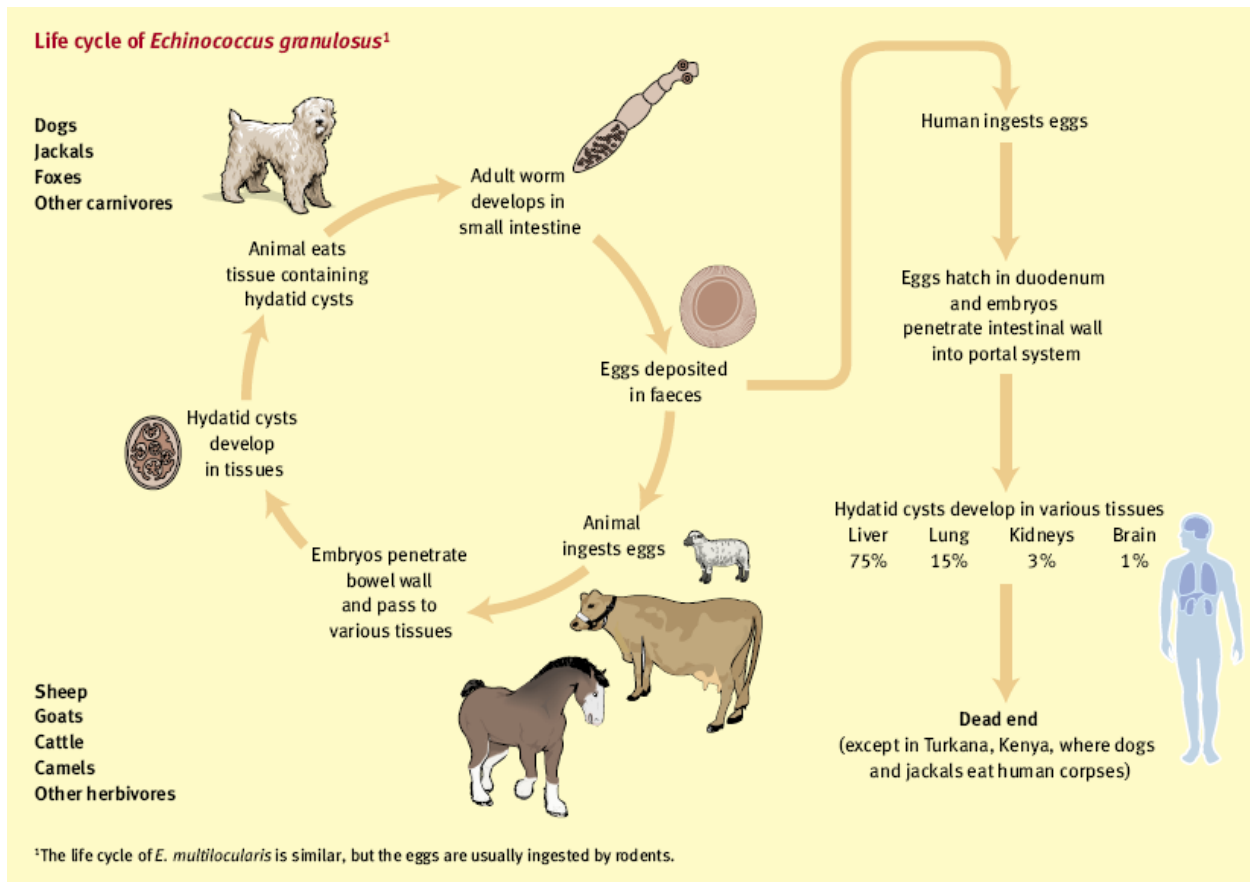


Figura 1. Ciclo biológico de *Echinococcus granulosus*. Tomado de Del Brutto, 2005

Biología del cáncer

En la mayoría de los órganos y tejidos de un animal maduro, existe un balance entre la proliferación y la muerte celular. Bajo condiciones normales, la proliferación celular se encuentra controlada para que la cantidad de un tipo celular determinado se mantenga siempre constante. Sin embargo, ocasionalmente surgen células que no responden a los mecanismos normales de control de crecimiento. Estas células que perdieron la sensibilidad a

los mecanismos de control, dan lugar a clones que pueden expandirse hasta alcanzar un tamaño considerable, generando así un tumor (Kindt et al, 2007).

Los tumores pueden clasificarse en benignos y malignos. Los tumores benignos son los que no presentan la capacidad de crecer indefinidamente ni de invadir tejidos sanos. En cambio, los tumores malignos continúan creciendo y son invasivos, generando metástasis. El término cáncer refiere específicamente al tumor maligno. Los tumores malignos son clasificados de acuerdo al origen embrionario del tejido del cual deriva el tumor primario. Se denomina como carcinomas a los cánceres que se originan del ectodermo y endodermo, mientras que los que se originan del mesodermo se denominan sarcomas. Las leucemias y linfomas son tumores malignos de células hematopoyéticas de la médula ósea (Kindt et al, 2007).

La transformación celular puede ser causada tanto por factores externos como por factores internos. Dentro de los factores externos se encuentran organismos infecciosos como los virus, como algunos subtipos de HPV, hepatitis B y C y el virus de Epstein-Barr (Martin et al, 2008; McLaughlin-Drubin et al, 2008). Otros organismos como las bacterias -entre ellas *Helicobacter pylori*- y helmintos como *Schistosoma haematobium* (Ferguson, 1911; Chen & Mott, 1989; Parra et al, 1991; Abdel et al, 2000) y *Opisthorchis viverrini* (Viranuvatti & Mettiyawongse, 1953; Riganti et al, 1989; Gentile & Gentile, 1994) también son carcinogénicos humanos. Se estima que un 16% de los casos de cáncer son causados por agentes patógenos (Pisani et al, 1997). Los posibles mecanismos por los que ciertos parásitos inducirían cáncer incluyen el establecimiento de inflamación crónica (Grivennikov et al, 2010), la modulación del sistema inmunitario del hospedero, la alteración de vías de regulación de la proliferación, la inducción de inestabilidad genómica y la inhibición de la comunicación intracelular (Herrera et al, 2005). También se encuentran dentro de los factores externos la dieta, el tabaco, etc. (Peto, 2001).

Dentro de los factores carcinogénicos intrínsecos, se encuentran entre otras las mutaciones heredadas, ciertas influencias hormonales y la condición inmunológica. Un número

de estudios han revelado que la incidencia del cáncer de mama es incrementada por el embarazo y cuando son administrados estrógenos de forma oral, mientras que disminuye en casos de menarca tardía, menopausia temprana y alta cantidad de partos; evidenciando la influencia hormonal en este tipo de cáncer (Peto, 2001).

Los polimorfismos en oncogenes o en genes supresores de tumor pueden provocar un moderado aumento en el riesgo de desarrollar cáncer. Un ejemplo de esto es el polimorfismo de un único nucleótido (SNP, single nucleotide polymorphism) I1307K, en el gen APC, que casi duplica el riesgo de desarrollar cáncer de colon en los individuos que lo presentan (Peto, 2001).

En el mundo occidental el cáncer es la segunda causa de muerte, precedida sólo por enfermedades cardiovasculares. Como puede observarse en la figura 2, en el Uruguay el cáncer de pulmón es el de mayor mortalidad entre los hombres (el cáncer de próstata es de mayor incidencia pero menor mortalidad); mientras que la muerte por cáncer de mama es la de mayor incidencia y mortalidad entre las mujeres (Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer, 2008).

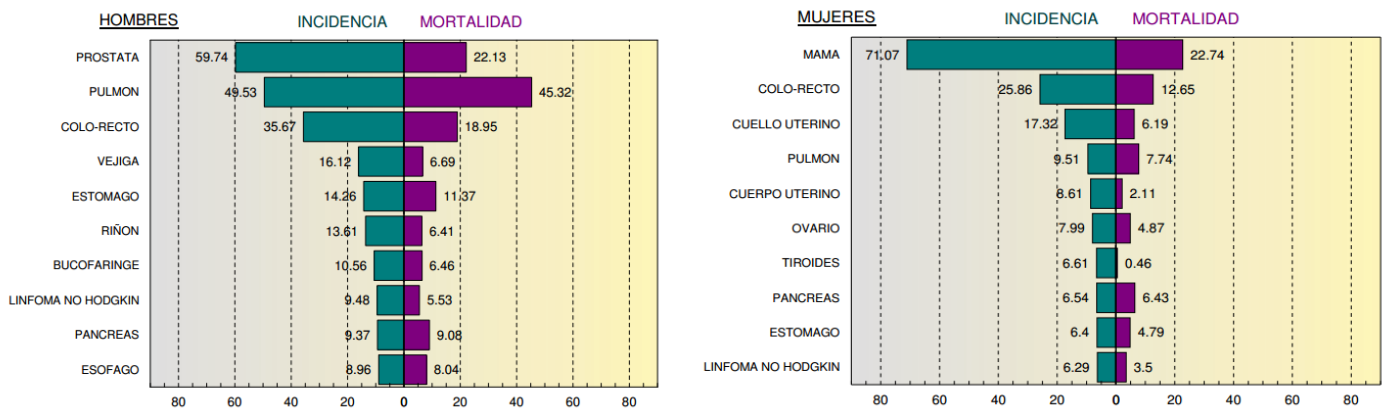


Figura 2. Datos epidemiológicos del cáncer en Uruguay 2004-2008. Se muestra para los tipos de cáncer más comunes su tasa de incidencia y de mortalidad para hombres y mujeres por separado. Tomado de Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer, 2008.

Inmunidad y cáncer

En 1909, Paul Ehrlich fue uno de los primeros en proponer el concepto de que el sistema inmune presenta un rol crítico en la protección de un individuo contra el cáncer. Proponía que de otra forma, la incidencia del cáncer sería ampliamente superior (Ehrlich, 1909). En la década del '50, Frank MacFarlane Burnet y Lewis Thomas postularon la hipótesis de la inmunovigilancia del cáncer. Estos autores postularon que las células del sistema inmune pueden detectar y destruir las células tumorales, previniendo la manifestación clínica del tumor. El sistema inmune habría evolucionado, al menos en parte, para controlar el crecimiento desmedido de células malignas (Burnet, 1970; Dunn et al, 2002).

La participación del sistema inmunológico en la generación de defensas contra el cáncer ha sido evidenciada ampliamente. La mayor incidencia de cáncer en individuos con el sistema inmunitario deprimido es una evidencia fuerte de la existencia de mecanismos inmunológicos antitumorales. Estudios en murinos con diferentes inmunodeficiencias mostraron una mayor susceptibilidad al desarrollo de tumores, tanto espontáneos como inducidos por carcinógenos, que sus contrapartes inmunocompetentes (Dunn et al, 2006).

Por otro lado, si se inyectaban ratones con células tumorales irradiadas que no podían crecer, estos ratones generaban protección contra posteriores inyecciones con una dosis normalmente letal de células viables del mismo tumor. Estos efectos protectores no son observados en ratones deficientes de células T, pero pueden ser conferidos por la transferencia de células T de otro ratón, demostrando la necesidad de las células T para mediar todos estos efectos. Estas observaciones indican que los tumores expresan péptidos antigénicos que pueden convertirse en blanco de una respuesta tumor específica mediada por células T. Estos antígenos de rechazo tumoral son expresados por tumores murinos inducidos experimentalmente, y son usualmente específicos para un tumor individual. Por lo tanto, la inmunización con células tumorales irradiadas de un tumor protege al ratón contra la invasión por células vivas del mismo tumor, pero no tiene efecto contra células pertenecientes a otro tumor (Old & Boyse, 1964; Murphy, 2011).

El término inmunovigilancia ha evolucionado a un concepto más complejo y amplio, la inmunoedición, introducido por Robert D. Schreiber. La inmunoedición se define por tres eventos claves: eliminación, equilibrio y escape (Dunn et al, 2002; Quezada et al, 2011). La fase de eliminación es la visión contemporánea de la hipótesis original de inmunovigilancia, en donde los sistemas inmunes innato y adaptativo actúan juntos para erradicar el tumor en desarrollo (Figura 3)(Bhatia & Kumar, 2011).

Aún no se han dilucidado completamente los mecanismos de reconocimiento de las células tumorales, ni cómo es activado el sistema inmune naïve por la transformación. Se cree que la expresión de ligandos inducidos por señales de estrés es uno de los mecanismos gatillados por el ADN dañado que puede alertar a células vecinas de la transformación temprana. Otras señales de peligro, que son liberadas por células recientemente transformadas o por células tumorales moribundas, pueden proveer de señales suficientes para alertar y activar el sistema inmune (Chow et al, 2012).

Estas señales de peligro pueden ser reconocidas por células de la inmunidad innata como pueden ser células “natural killer” (células NK), macrófagos, células T $\gamma\delta$ y células T “natural killer” (células NKT). En respuesta a las señales de peligro, las células NK y los macrófagos secretan citoquinas inflamatorias -como por ejemplo interferón gamma (IFN- γ) producida por las células NK- generando mecanismos supresores de tumor. El IFN- γ activa procesos antiproliferativos, proapoptóticos y angiostáticos, que combinados con la acción de otras de las interleuquinas secretadas, llevan a la muerte de un número significativo de células tumorales. A través de la producción de intermediarios reactivos del oxígeno y del nitrógeno por los macrófagos, y de mecanismos dependientes de perforina mediados por células NK, se da la muerte de células tumorales adicionales. De esta forma se generan antígenos tumorales que pueden ser capturadas por células dendríticas reclutadas en el tumor. Estas células dendríticas que capturaron antígenos tumorales y se activaron, migran al nódulo linfático que drena el tumor y allí activan a células T CD4⁺ y CD8⁺ “naïve”. Las células T CD4⁺ y CD8⁺ tumor

específicas migran hacia el tumor para eliminar células tumorales viables que expresan dichos antígenos tumorales (Bathia & Kumar, 2011).

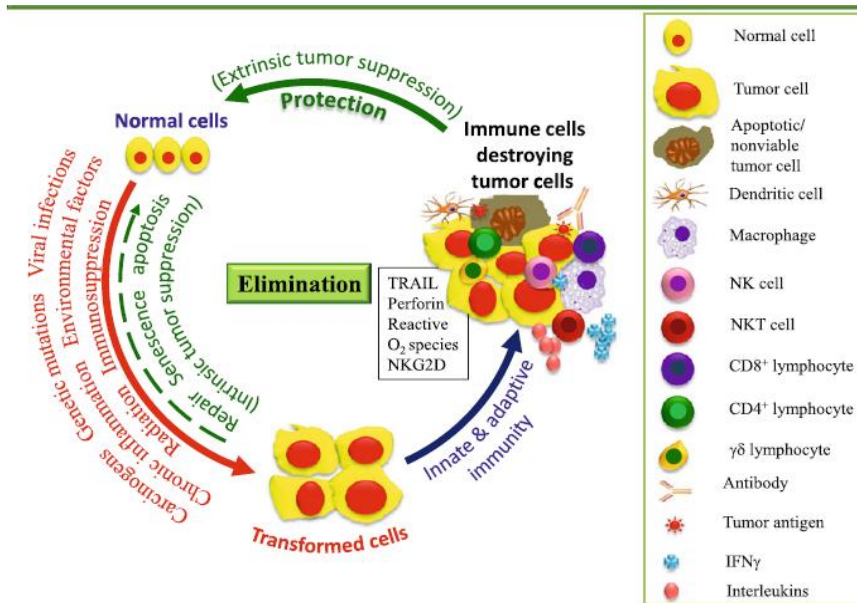


Figura 3. Fase de eliminación de la inmunodeficiencia. La transformación de células normales es generalmente prevenida por mecanismos intrínsecos como puede ser la reparación del ADN, la apoptosis o la senescencia. Al fallar estos mecanismos eliminación de células transformadas, mecanismos extrínsecos son inducidos para eliminar estas células transformadas. Estos mecanismos extrínsecos involucran tanto respuesta de la inmunidad innata como adaptativa. Tomado de Bhatia y Kumar 2011.

Si la eliminación no es completamente exitosa, se entra en la fase de equilibrio, en donde las células tumorales experimentan cambios o mutaciones que ayudan a su supervivencia como resultado de presiones selectivas impuestas por el sistema inmune (Figura 4). Al contrario de las fases de eliminación y escape, que requieren de componentes del sistema inmune innato y adaptativo, la fase de equilibrio es mantenida únicamente por la inmunidad adaptativa (Koebel et al, 2007). La presión selectiva inmune, causada por la intensiva interacción entre las células del sistema inmune y células tumorales, eventualmente induce la aparición de células tumorales con inmunogenicidad reducida. Estas células tumorales con inmunogenicidad reducida, son capaces de sobrevivir en un individuo inmunocompetente. Como la fase de equilibrio involucra la continua erradicación de las células tumorales, y la

continua emergencia de variantes resistentes de células tumorales por la presión selectiva inmune, es posible que la fase de equilibrio sea la más larga de los tres procesos de la inmunoección del cáncer (Chow et al, 2012; Bhatia & Kumar, 2011).

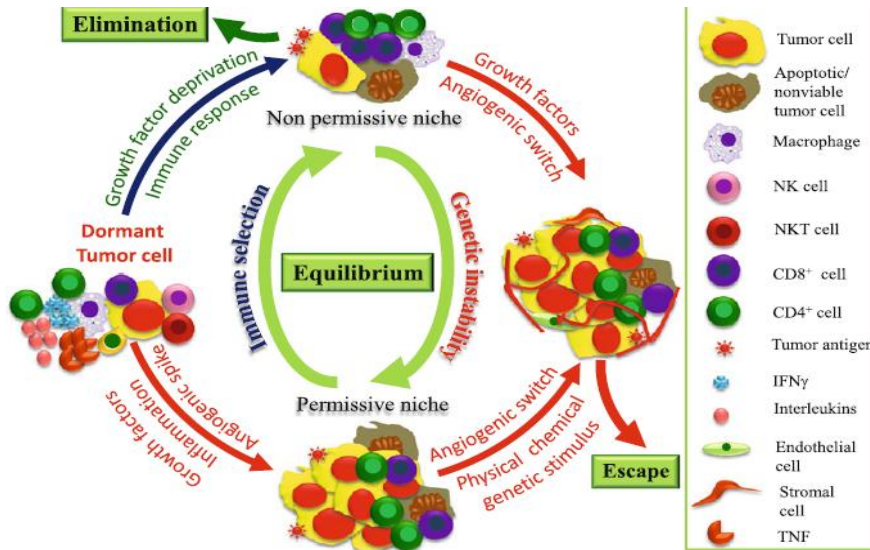


Figura 4. Fase de equilibrio de la inmunoección. Algunas células tumorales logran sobrevivir a la fase de eliminación y entran en estado de latencia. Durante las etapas tempranas del equilibrio las células tumorales son quiescentes y poseen una tasa de apoptosis baja sin incremento en el tamaño del tumor. Tomado de Bhatia y Kumar 2011.

Luego de la pérdida de la mayoría de los mecanismos intrínsecos y extrínsecos supresores tumorales, las células tumorales entran en la fase de escape (Figura 5). El escape de las células tumorales puede ocurrir a través de dos grandes cambios que ocurren a nivel de la célula tumoral per se y/o a nivel del microambiente tumoral. La reducción de la inmunogenicidad de las células tumorales puede disminuir el reconocimiento inmune. Además, las células tumorales pueden adquirir resistencia contra las funciones citotóxicas de las células del sistema inmune, como puede ser la expresión de moléculas anti-apoptóticas que impidan la muerte de las células tumorales. A nivel del microambiente tumoral, el escape puede ocurrir por la emergencia de una red inmunosupresiva. Varios factores producidos por células tumorales y células del sistema inmune, como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), la interleuquina 10 (IL-10) y la

prostaglandina E₂, contribuyen al establecimiento del microambiente inmunosupresivo (Chow et al, 2012; Bhatia & Kumer, 2011). Las células tumorales que acumularon suficientes mutaciones para evadir el sistema inmune, pueden crecer sin obstáculos hasta ser clínicamente detectables.

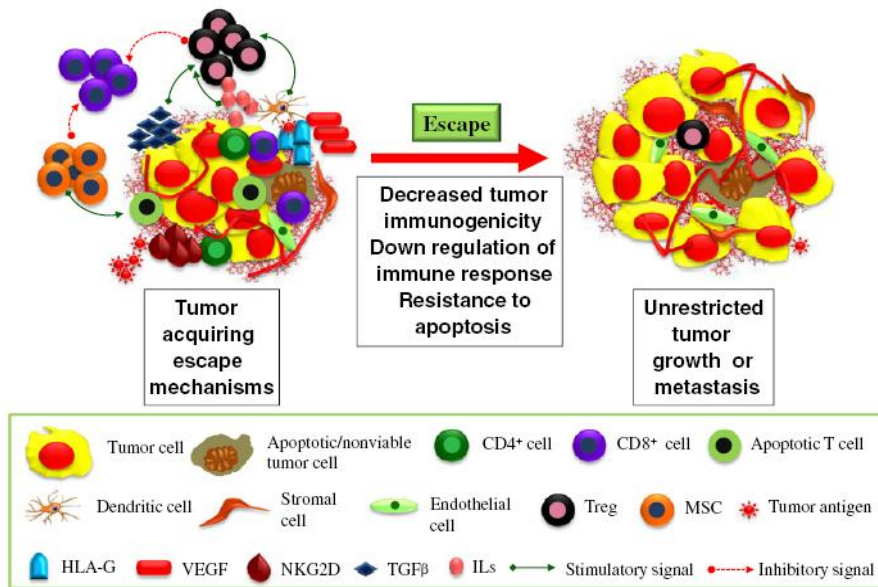


Figura 5. Fase de escape de la inmunoedición. En un ambiente favorable, las células tumorales ocultan sus antígenos y otras moléculas reconocidas por las células de la inmunidad, volviendo al tumor menos inmunogénico. Al darse un aumento de la vascularización en el tumor (gracias a factores de crecimiento como VEGF) y en la resistencia a la apoptosis, el tumor escapa al sistema inmunitario, pueden crecer sin restricciones a tamaños clínicamente detectables y hasta generar metástasis. Tomado de Bhatia y Kumar 2011.

En la actualidad se ha aceptado el rol que cumple la inflamación en la tumorigénesis, el microambiente inflamatorio es un componente esencial de todos los tumores. La inflamación actúa en todos los pasos de la tumorigénesis, desde el inicio a través de la promoción del tumor, hasta la progresión metastásica. En tumores en desarrollo los mecanismos inmunes antitumorigénicos y protumorigénicos coexisten, pero si el tumor no es eliminado completamente, el efecto protumorigénico es el dominante. Se ha sugerido que el ambiente

inflamatorio incrementa la tasa de mutación, además de promover la proliferación de células mutadas (Grivennikov et al, 2010).

Antígenos tumorales

Una variedad de antígenos que pueden ser reconocidos por linfocitos T y B han sido identificados tanto en cánceres humanos como en animales. La primera clasificación de los antígenos tumorales fue en base a sus patrones de expresión. Los antígenos que se encuentran únicamente en las células tumorales, pero no en las normales, se los denomina antígenos tumor-específicos. Dichos antígenos pueden resultar de mutaciones en las células tumorales que generan proteínas celulares alteradas (Kindt et al, 2007; Abbas et al, 2010).

Por otro lado, los antígenos tumorales que también se expresan en células normales se los denomina antígenos asociados a tumor; generalmente estos antígenos son constituyentes celulares normales cuya expresión es aberrante o desregulada en los tumores. Varios factores de crecimiento son expresados en niveles significativamente mayores en las células tumorales, pudiendo servir como antígenos asociados a tumor. Ejemplos de estos últimos son el factor de crecimiento epidermal (EGF) y el factor de crecimiento transferrina (p97), entre otros. Algunos de los antígenos asociados a tumores se encuentran expresados en células fetales normales, pero no en el adulto. Estos antígenos aparecen temprano durante el desarrollo embrionario, cuando el sistema inmune es inmaduro e incapaz de generar una respuesta. Por lo tanto, cuando son expresados en células tumorales pueden ser reconocidos por el sistema inmunológico y generar una respuesta (Kindt et al, 2007; Abbas et al, 2010).

Los antígenos tumorales reconocidos por células T humanas se encuentran comprendidos en una de las cuatro categorías siguientes: antígenos codificados por genes que se expresan exclusivamente en las células tumorales; antígenos codificados por genes normales alterados por mutaciones; antígenos normalmente expresados únicamente en ciertas etapas del desarrollo; o antígenos que son sobreexpresados en algunos tumores (Kindt et al, 2007).

Inmunoterapia anti-tumoral

Las tres terapias convencionales contra el cáncer son la resección quirúrgica, la quimioterapia y la radiación. La inmunoterapia es considerada la cuarta terapia, todavía en fase de investigación, observándose resultados prometedores en algunos ensayos clínicos en humanos (Dimberu & Leonhardt, 2011; Waldmann, 2003).

Durante la última década, se ha puesto un gran esfuerzo en el desarrollo de inmunoterapias para el tratamiento del cáncer como alternativa de las tradicionales quimioterapia y radioterapia (Pardoll, 1998; Myc et al, 2011). El objetivo de la inmunoterapia para el tratamiento del cáncer es desarrollar vacunas que puedan generar potentes respuestas inmunes anti-tumorales sin efectos secundarios. La estrategia es estimular tanto la inmunidad innata como adaptativa, causando el reconocimiento de tumores con la subsecuente eliminación del mismo (Myc et al, 2011).

Ha sido ampliamente reportado en la literatura la existencia de antígenos tumor-específicos que pueden ser blanco de una respuesta inmunológica (Renkvist et al, 2001). Gracias a los avances en la genómica del cáncer, cada vez son más numerosos los antígenos tumor-específicos que podrían ser blancos potenciales de inmunoterapia.

Para generar una inmunidad anti-tumoral efectiva, se tienen que lograr tres pasos, ya sea espontáneamente o terapéuticamente (Figura 6). En primer lugar, para iniciar una respuesta inmune, las células dendríticas deben presentar antígenos derivados del tumor. A su vez, las células dendríticas deben recibir señales de activación, pudiendo así diferenciarse para promover una respuesta inmune, de lo contrario inducirían tolerancia a dichos antígenos generando una respuesta opuesta a la anti-tumoral (Mellman et al, 2011). Luego, en los órganos linfáticos, las células dendríticas que presentan antígenos derivados del tumor, deben generar respuestas efectivas mediadas por células T. Finalmente, las células T tumor-específicas deben infiltrar el tumor para desarrollar su función, evitando la inmunosupresión por el tumor. Como se mencionó anteriormente, los tumores pueden escapar del ataque por el sistema

inmune a través de una variedad de mecanismos complementarios de inmunosupresión. Por lo tanto, son tres los potenciales sitios de intervención terapéutica: promover la función presentadora de antígeno de las células dendríticas, promover la producción de respuestas protectoras mediadas por células T, y evitar la inmunosupresión en el tumor (Mellman et al, 2011).

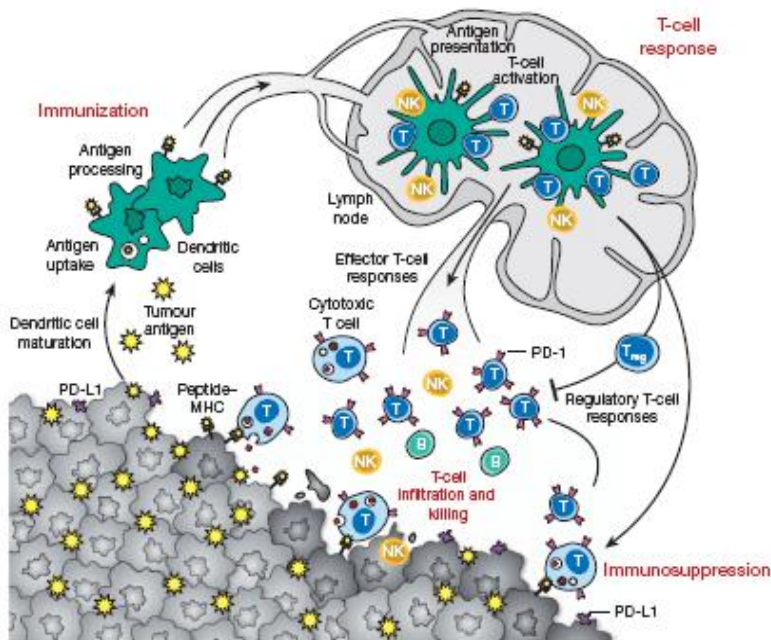


Figura 6. Generación y regulación de la inmunidad anti-tumoral. Una respuesta inmune anti-tumoral comienza con la captura de antígenos asociados a tumor por células dendríticas. Estas células que presentan antígenos tumorales, migran hacia los nódulos linfáticos que drenan el tumor. Si la presentación y captura del antígeno ocurre en un medio que estimula la maduración de dichas células dendríticas, éstas van a ser capaces de generar una respuesta efectora anti-tumoral mediada por células T. Las células T antígeno educadas, junto con células B y NK (Natural Killer), van a migrar del nódulo linfático al tumor, donde deben superar las señales inmunosupresivas que genera el ambiente tumoral. Tomado de Mellman et al, 2011.

Para que la inmunoterapia sea eficiente se requiere que las células tumorales expresen en su superficie antígenos que sean únicos (claramente diferentes a los de las células normales), expresados constitutivamente durante el ciclo celular y que su expresión

constitutiva sea esencial para la supervivencia de las células (Myc et al, 2011). Sin embargo, no existen evidencias de la existencia de componentes en la membrana plasmática únicos de cáncer que cumplan con todos requisitos planteados anteriormente (Darzynkiewicz, 2006).

Actualmente se emplean clínicamente anticuerpos monoclonales tumor específicos, como puede ser el rituximab, trastuzumab y bavacizumab. Existen resultados que evidencian como mecanismo principal de actividad de estos anticuerpos monoclonales la citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC) (Topalian et al, 2011).

Relación entre células tumorales y parásitos

En los últimos años se ha observado que la infección por ciertos parásitos reduce la incidencia de cáncer. Un estudio epidemiológico realizado en Turquía determinó una relación inversa entre la incidencia de cáncer e infección por el parásito *Echinococcus granulosus*, agente causal de la hidatidosis. Se observó que personas infectadas por dicho parásito presentaban una incidencia significativamente menor de cáncer que personas no infectadas (Akgül et al, 2003). Por otro lado, no se ha observado aumento de la incidencia de cáncer de colon en pacientes con megacolon chagásico, como sí se observa un aumento en la incidencia de cáncer de colon en pacientes con megacolon no chagásico. Esto sugiere la existencia de protección contra el cáncer de colon en pacientes infectados por *Trypanosoma cruzi* (Garcia et al, 2003). Apoyando lo anterior, estudios en ratas infectadas crónicamente con *T. cruzi* mostraron una menor incidencia de cáncer de colon inducido por 1,2 dimetilhidracina comparado con los animales no infectados (Oliveira et al, 2001). Es posible explicar a nivel molecular la actividad anti-tumoral de *T. cruzi* por la presencia de calreticulina en el parásito, la cual posee actividad anti-angiogénica (Molina et al, 2005; Martins et al, 2010). Por otra parte, la gp82 del parásito puede inducir la muerte apoptótica de células de melanoma (Atayde et al, 2008).

Se ha observado que la infección con *Toxoplasma gondii* en ratones con cáncer, Lewis Lung Carcinoma, induce actividad antitumoral y antimetastásica, viéndose aumentada la

sobrevida, el porcentaje de células T CD8+ y las respuestas citotóxicas (Kim et al, 2007). Una respuesta similar se observa en los ratones con cáncer, Lewis Lung Carcinoma, que son infectados con el parásito intracelular del género *Plasmodium*, causante de la malaria. Observando una disminución de la proliferación de las células tumorales, y en la angiogénesis del tumor, así como un aumento en la apoptosis de las células tumorales, en ratones con cáncer infectados con el parásito de la malaria. A su vez, los ratones que presentaron regresión tumoral, rechazaron posteriores inoculaciones de las mismas células tumorales (LLC), sugiriendo la generación de respuestas adaptativas contra el tumor (Chen et al, 2011).

Se ha observado que existen similitudes entre parásitos y células tumorales en varios aspectos, como por ejemplo la presencia de ciertas estructuras antigénicas. Un paradigma de esto es el antígeno Sm23, expresado en la superficie de *Schistosoma mansoni*, que presenta un elevado nivel de homología a nivel de secuencia y de estructura con respecto al antígeno ME491 presente en melanomas y otros tipos de tumores malignos (Wright et al, 1990). Recientemente se ha descrito que la proteína tropomiosina de *Trichinella spiralis* presenta similitudes con antígenos de la línea celular tumoral de mieloma SP2/0 (Gong et al, 2011).

Los patrones de O-glicosilación observados en cáncer son distintos al 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. Entre ellos se encuentran los antígenos Tn (GalNAc- α -Ser/Thr), Tk, sialil-Tn (N-acetylneuraminic acid- α 6-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 (Brockhausen, 2006). Se cree que la

presencia de este tipo de alteraciones en las células tumorales, les confiere propiedades relacionadas con la invasividad, la metástasis, la pérdida de adhesión y la evasión de las respuestas inmunes (Van Kooyk et al, 2008).

Diversos motivos de glicosilación incompleta característicos de determinadas células tumorales (Tn, TF, sialil-Tn y Tk) también han sido encontrados en varios parásitos (Osinaga, 2007; Ubillos et al, 2007). En el cestodo *Echinococcus granulosus* y en el platelminto *Fasciola hepatica*, fueron identificados los antígenos asociados a tumor Tn, sialil-Tn y TF (Alvarez-Errico et al, 2001; Freire et al, 2003a; Casaravilla et al, 2003). Fue demostrada la presencia del antígeno Tn y TF en el parásito *Schistosoma mansoni* (Nyame et al, 1987; Thors et al, 2006), mientras que se identificó al antígeno TK en los parásitos *Taenia hydatigena*, *Mesocestoides corti* y *Taenia crassiceps* (Ubillos et al, 2007). Por otro lado, fue evidenciada la presencia de sialil-Tn en la superficie del parásito *Trypanosoma cruzi* (Freire et al, 2003b).

Objetivos

Como se mencionó anteriormente, se ha reportado una relación inversa entre la incidencia de cáncer y la infección por el parásito *E. granulosus*. Nuestra hipótesis de trabajo es que la actividad anti-tumoral observada se debe, al igual que en *T. cruzi*, a una reactividad cruzada entre los anticuerpos generados contra *E. granulosus* y antígenos expresados por determinadas líneas tumorales. Estos anticuerpos reconocerían las células tumorales y ayudarían a mantener la homeostasis al controlar el crecimiento tumoral.

El objetivo de esta Tesina fue determinar si la aparente protección generada por la infección con el parásito frente al cáncer, se debe, al menos en parte, a la respuesta humoral generada contra el parásito. Si esto fuera así, los anticuerpos generados contra el líquido hidatídico de *Echinococcus granulosus* deberían presentar reactividad cruzada contra líneas celulares cancerígenas de ratón (LL/2 y CT26).

Objetivos específicos

- Evidenciar la reactividad cruzada entre los extractos de las líneas tumorales LL/2 y CT26, y el líquido hidatídico.
- Identificar cuáles son los antígenos tumorales involucrados en la reactividad cruzada.

Identificar los antígenos de las células tumorales que son reconocidos por los anticuerpos contra *E. granulosus* puede ser de gran importancia para el desarrollo de nuevas estrategias de inmunointervención anti-tumoral, tanto profilácticas como terapéuticas.

Materiales y Métodos

Líneas celulares

Se trabajó con dos líneas celulares, una línea de cáncer de colon de ratón (CT26) y otra de cáncer de pulmón de ratón (LL/2), adquiridas de American Type Culture Collection (ATCC). La línea celular LL/2 fue cultivada en medio DEMEM (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 CO₂. La línea celular CT26 fue cultivada en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute), 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 CO₂.

Extractos celulares

Se prepararon extractos celulares de las líneas LL/2 y CT26 (procedentes de cultivos en fase exponencial de crecimiento), para ello, se lavaron 2 veces con PBS y luego se las incubó por 30 min en baño de hielo con buffer de hipotónico (Tris 10 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM con inhibidores de proteasas). Posteriormente se procedió al sonicado (6 pulsos de 10 s, 10 s de descanso, con 10 % amplitud). El sobrenadante de la centrifugación a 4600 rpm y 4⁰C durante 10 min de la muestra sonicada, se almacenó a -20⁰C hasta su posterior utilización en electroforesis monodimensional.

Para la electroforesis bidimensional, se prepararon los extractos de las líneas LL/2 y CT26 (en fase de crecimiento exponencial) incubándolas en buffer de lisis (Tris 30 mM, Tiourea 2M, Urea 7 M, CHAPS 4% pH 8.5 con inhibidores de proteasas) a temperatura ambiente durante 30 min. La muestra se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se utilizó para la electroforesis bidimensional.

Líquido hidatídico

El líquido hidatídico fue obtenido de quistes hidatídicos humanos y bovinos en condiciones de esterilidad por el Dr. Edgardo Berriel (Clínica Quirúrgica “1”, Hospital Pasteur). Se eliminaron los elementos formes por ultracentrifugado y ultrafiltrado.

Determinación de la concentración proteica

La concentración de proteínas de los extractos celulares y en el líquido hidatídico fue determinada mediante el método colorimétrico del ácido bicinconínico (BCA). Para esto, 10 μL de muestra fue incubada con 200 μL de BCA- CuSO_4 (en una relación 50:1) durante 30 minutos a 37°C. Se realizó una curva de calibración de BSA en el rango de 0.1 a 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y luego se midió la absorbancia de las muestras a 570 nm.

Se cuantificaron los extractos celulares preparados para electroforesis bidimensional por el método colorimétrico Bradford, ya que la elevada concentración de Urea presente en el buffer de lisis interfiere en el método de BCA. Para ello, 5 μL de la muestra se incubaron con 150 μL de reactivo Bradford (Sigma-Aldrich), durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego de dicho tiempo se midió la absorbancia a 595 nm. Al igual que en el método anterior, se realizó una curva de calibración de BSA en el rango de 0.1 a 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Producción de anticuerpos policlonales anti-Líquido Hidatídico

Se produjo suero anti-líquido hidatídico tanto en conejo como en ratón. Para el caso de los ratones, se los inoculó vía subcutánea con 300 μg de proteínas de líquido hidatídico utilizando hidróxido de aluminio como adyuvante. En el día 0 se les extrajo sangre, a partir del cual se obtuvo el suero pre-inmune. Luego de los 15 días se les realizó un refuerzo inoculándoles 300 μg de proteínas de líquido hidatídico. Pasado una semana se les extrajo sangre para obtener el suero hiper-inmune.

En el caso de los conejos, al igual que a los ratones, en el día 0 se les extrajo sangre, de la cual se obtuvo el suero pre-inmune de conejo. Se los inoculó, vía subcutánea con 200 µg de proteínas de líquido hidatídico por cada kilo de peso del conejo. Se realizaron 3 inoculaciones espaciadas por 15 días.

El suero se obtuvo de la centrifugación de las muestras de sangre a 3000 rpm durante 5 minutos, conservándose el sobrenadante. La reactividad de los sueros fue evaluada por el método de ELISA, y se los conservó a -20°C.

ELISA

La reactividad de los sueros de conejo y ratón anti-Líquido Hidatídico, se realizó mediante el método ELISA (acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Se sensibilizaron placas de ELISA de fondo plano (Nunc) con 10 µg de proteína de líquido hidatídico por pocillo en buffer carbonato (NaHCO_3 - Na_2CO_3 0.05 M pH 9.6), durante toda la noche a temperatura ambiente en campana de extracción de gases. Luego del sensibilizado, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con solución de bloqueo (PBS-gelatina 1%) durante 1 hora y media a 37°C. Se lavó la placa 3 veces con PBS-Tween₂₀ 0.1%. Luego se procedió a incubar con diluciones en PBS-gelatina 0.5%-Tween₂₀ 0.1% de los sueros anti-líquido hidatídico y pre-inmune durante 1 hora a 37°C. Se lavó la placa 3 veces con PBS-Tween₂₀ 0.1% y se procedió a la incubación durante 1 hora a 37°C de una dilución adecuada del anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa, 1/2000 para el anti-conejo (Dako) y 1/1000 para el anti-ratón (Sigma-Aldrich). Se realizaron 5 lavados con PBS-Tween₂₀ 0.1%, y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad con el sustrato, ABTS (2,2-azinobis (ácido 3-etilbenzo-tiazolino-6-sulfónico)) 0.3 mg/mL en buffer citrato-fosfato (Na_2HPO_4 0.072 M, Ácido cítrico 0.028 M) pH 5 y H_2O_2 24%. Se midió la absorbancia a 405 nm.

Para comprobar que la unión de los anticuerpos fue específica, se realizaron varios controles. Por un lado, se sensibilizaron pocillos sin antígeno, únicamente con buffer carbonato, de manera de poder determinar la unión inespecífica de los anticuerpos presentes en el suero

con los componentes de dicho buffer. También se determinó la unión inespecífica del anticuerpo secundario con el antígeno adsorbido en la placa, ya que a un pocillo no se lo incubó con el anticuerpo primario pero sí con el anticuerpo secundario. Como blanco se utilizó un pocillo al que se le agregó únicamente el sustrato, no se sensibilizó con líquido hidatídico ni se lo incubó con anticuerpos, de manera de poder determinar la absorbancia propia del reactivo cromogénico.

Western Blot

Se diluyó cada extracto y el líquido hidatídico en buffer de carga (β -mercaptoetanol 25%, SDS 2.5%, Glicerol 50%, Buffer Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, Azul de bromofenol 0.1 mg/mL) de manera de sembrar, 50 μ g de proteína de extracto celular y 3 μ g de líquido hidatídico (como control positivo), en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras para la realización de una SDS-PAGE. Previamente al sembrado del gel, las muestras se incubaron a 99°C durante 5 minutos para su desnaturalización.

El gel se dejó correr por 1 hora a 150 V. Una vez corrido, se equilibró el gel en buffer de transferencia (Tris base 25 mM, Glicina 192 mM, etanol 20%) durante 20 minutos. Luego se procedió a la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa Hybond-C (GE Healthcare) mediante la técnica de electrotransferencia semi-seca durante 1 hora a 15 V.

Para permitir cortar la membrana en tiras de acuerdo a lo sembrado en los carriles, se tiñó la membrana con una solución de Rojo de Ponceau, que tiñe proteínas, pudiendo visualizar así los distintos carriles del gel transferidos a la membrana. Posteriormente, se bloquearon los sitios inespecíficos con una solución de seroalbúmina bovina al 3 % a 4°C durante toda la noche.

La membrana se incubó con suero anti-líquido hidatídico de ratón y de conejo en dilución 1/800 y 1/1600 respectivamente en PBS-BSA 0.1% Tween₂₀ 0.1%, durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con

PBS-Tween₂₀ 0.2%. Luego se procedió a la incubación durante una hora con anticuepo anti-ratón o anti-conejo conjugado a peroxidasa, según sea el caso. El anticuerpo anti-ratón (Dako) se utilizó en dilución 1/2500 en PBS-BSA 0.1% Tween₂₀ 0.1%, mientras que el anticuerpo anti-conejo (Dako) se utilizó en dilución 1/3000 en PBS-BSA 0.1% Tween₂₀ 0.1%. La membrana se lavó 5 veces de 10 minutos con PBS-Tween₂₀ 0.2%. Se reveló con el reactivo ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) incubándolo 1 minuto y luego exponiéndolo en oscuridad junto con un film (Amersham Hyperfilm ECL GE).

Como control se utilizó suero pre-inmune de ratón y de conejo, para diferenciar el reconocimiento de proteínas en el extracto celular por anticuerpos generados en respuesta a la inoculación con LH, del reconocimiento por anticuerpos naturales.

Electroforesis bidimensional

Con el objetivo de identificar las proteínas que presentan reactividad cruzada en el extracto total de células tumorales LL/2 y CT26 con los anticuerpos anti-líquido hidatídico, se realizaron electroforesis bidimensionales para su posterior análisis por espectrometría de masa.

Primeramente las proteínas de la muestra se separaron según su punto isoeléctrico, utilizando tiras de 7 cm de rango de pH no lineal de 3-11 (Immobiline drystrips, GE Healthcare). Para ello, 200 µg de proteína del extracto total de LL/2 o de CT26 fueron diluidos en solución de rehidratación (8 M Urea, 0.5% CHAPS, 0.3% DTT, 0.5% IPG buffer (GE Healthcare) y 0.002% azul de bromofenol) y sembrados en strips holders, se colocó por encima la tira y se recubrió con aceite mineral.

Se realizó un isoelectroenfoco utilizando el IPGPhor (Amersham Bioscience), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Primeramente, se realizó una rehidratación pasiva de las tiras entre 12 y 15 horas. Luego se realizó un step and hold a 300 V durante 4 horas, siguiéndole un gradiente hasta 1000 V por 30 minutos, un gradiente hasta 5000 V por 1 hora y 20 minutos, y por último un step and hold a 5000 V por 30 minutos.

Una vez culminado el isoelectroenfoque, se procedió a la separación de las proteínas según su peso molecular. Para ello, las tiras se equilibraron en buffer de equilibración (6 M Urea, 75 mM Tris-HCl pH 8.8, 2.3% glicerol, 2% SDS, 0.002% azul de bromofenol) con ditionitritol (DTT) 10 mg/mL durante 15 minutos. Luego se incubaron las tiras durante 15 minutos en buffer de equilibración con iodoacetamida 25 mg/mL. Una vez equilibradas las tiras, estas se colocaron sobre geles de poliacrilamida 12.5%. El marcador de peso molecular se sembró en papel de filtro, una vez seco (para evitar la difusión del marcador), se colocó sobre el gel de poliacrilamida. Luego se agregó una solución sellante de agarosa (Agarosa 0.5%, azul de bromofenol 0.002%) en buffer de corrida (Tris base 1.5 M). Se corrió los geles a 10 mA por, aproximadamente, 10 minutos y luego a 20 mA hasta que el frente de corrida alcanzó 1 cm del borde inferior del gel.

Luego de la corrida, uno de los geles fue teñido con Coomasie Blue coloidal (Sigma-Aldrich). Para lo que primeramente se fijaron las proteínas al gel con solución de fijación (10% ácido acético, 40% etanol). Luego se incubó toda la noche a temperatura ambiente, en agitación constante con solución Coomasie Blue coloidal y 20% de etanol.

El otro gel, se lo utilizó para realizar un Western Blot, siguiendo el mismo procedimiento explicitado anteriormente. Luego del Western Blot con el suero anti-líquido hidatídico, se realizó sobre la misma membrana un Western Blot con suero preinmune como control negativo. Para ello, la membrana fue previamente “strippeada” incubándola 10 minutos a 50°C en buffer de “stripping” (Tris base 62,5mM pH 6,7, 2%SDS y 100mM de β -mercaptoetanol). Se lavó la membrana 2 veces con PBS-Tween₂₀ 0.1%, y se la bloqueó con PBS-BSA 3% durante toda la noche a 4°C o 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 apta para 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 0,2 M: acetonitrilo. Las mezclas de péptidos tripticos 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 eluidas con 3 μl de una solución saturada de acido-ciano-4-hidroxicinamico (Sigma-Aldrich) 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 Analyzer, operado en el modo reflector. El mapa peptídico obtenido para cada muestra se comparó con las bases de datos no redundantes conocidas de digestiones tripticas 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 así la identificación de las proteínas de interés.

El análisis por espectrometría de masa de los “spots” escindidos fue realizado por la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Institut Pasteur de Montevideo.

Resultados

Producción de anticuerpos policlonales anti-líquido hidatídico

La actividad del suero anti-líquido hidatídico producido tanto en conejo como en ratón se evaluó mediante el método de ELISA. En la figura 7A se muestran los valores de absorbancia a 405 nm para distintas diluciones del suero pre-inmune (▪) y del suero post-inmune (●) de ratón obtenidos al día 0 y luego de una semana de la segunda inmunización, respectivamente. A partir de dicha grafica se observa la obtención de anticuerpos policlonales anti-líquido hidatídico.

Un resultado similar se obtuvo en la evaluación de la actividad del suero de conejo pre-inmune y post-inmune (Figura 7B). En este caso se observa saturación para las diluciones menores (1/100-1/800), visualizada por una meseta, que se debería a un mayor título de anticuerpos LH-específicos.

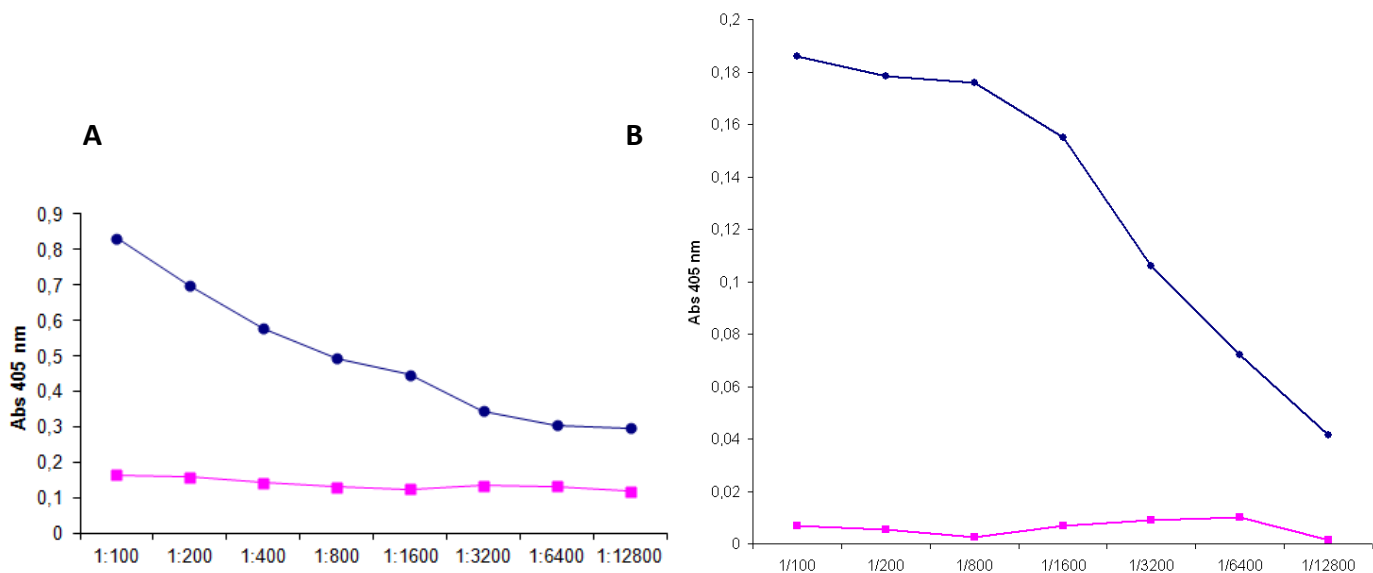


Figura 7. Evaluación de la actividad del suero post-inmune de ratón mediante ELISA. Se muestra para distintas diluciones la medida de absorbancia a 405 nm para (A) el suero pre-inmune de ratón (▪) y para el suero post-inmune de ratón (●); para (B) el suero post-inmune de conejo (●) y para el suero pre-inmune de conejo (▪).

Western Blot monodimensional

La reactividad cruzada entre las líneas CT26 (línea de cáncer de colon murino) y LL/2 (línea de cáncer de pulmón murino) y *Echinococcus granulosus* fue evidenciada mediante Western Blot. En la figura 8, se muestra el reconocimiento de proteínas del extracto celular de CT26 y LL/2 por los anticuerpos presentes en el suero, tanto post-inmune como pre-inmune. El patrón de reconocimiento es levemente diferencial entre el suero pre-inmune y post-inmune, siendo más evidente en el caso del suero de conejo. En la figura 8A se utilizó el suero pre-inmune y post-inmune de ratón en una dilución 1/800, el anticuerpo secundario anti-ratón se utilizó en dilución 1/2500. Utilizando el suero hiper-inmune se observaron bandas entre 55 KDa y 35 KDa que no aparecieron cuando se utilizó el suero pre-inmune (dichas diferencias se encuentran señaladas en la figura mediante flechas).

Por otro lado, en la figura 8B se muestran los datos obtenidos cuando se utilizó el suero pre-inmune y post-inmune de conejo en una dilución 1/1600, en presencia del anticuerpo secundario anti-conejo en dilución 1/3000. Tanto para el extracto de la línea celular CT26 como para la línea LL/2, se observa claramente una banda con un peso aproximado de 20 KDa cuando se incubó con el suero hiper-inmune. Esta banda no se observó para el caso del suero pre-inmune (Fig. 8B). Un análisis detallado permite visualizar otras diferencias menos notorias (indicadas con flechas), como puede ser en CT26 la constatación de una banda de aproximadamente 23 KDa y otra alrededor de 45 KDa con el suero post-inmune.

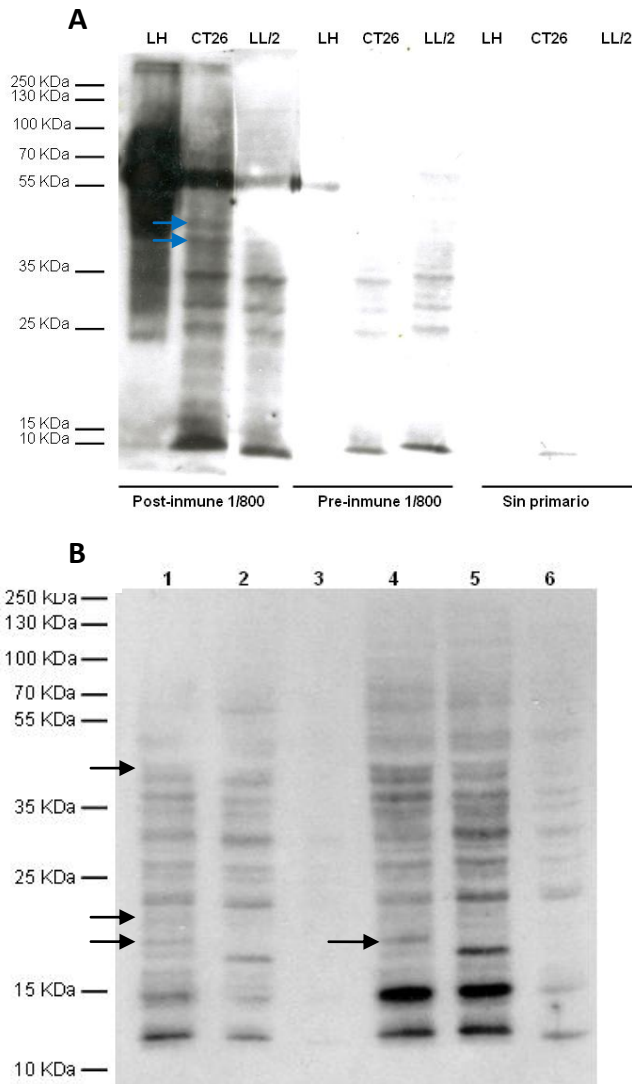


Figura 8. Western Blot monodimensional de extractos celulares de CT26 y LL2. (A) Se utilizó como anticuerpo primario suero pre-immune y post-immune de ratón. (B) En este caso se utilizó el suero post-immune y pre-immune de conejo. En los carriles 1, 2 y 3 se corrieron 50 μ g de extracto de CT26, y se incubaron con suero post-immune, pre-immune y sin primario, respectivamente. Mientras que en los carriles 4, 5 y 6 se corrieron 50 μ g de extracto LL/2, y se incubaron con suero post-immune, pre-immune y sin primario, respectivamente. Las diferencias en las bandas visualizadas con suero post-immune y pre-immune se encuentran indicadas con flechas.

Electroforesis Bidimensional

Se realizaron en paralelo 2 electroforesis bidimensionales, un gel fue teñido con Coomassie Blue coloidal y el otro fue utilizado para la realización de Western Blot, con el fin de la identificación de las proteínas involucradas en la reactividad cruzada entre el Líquido hidatídico y las líneas celulares CT26 y LL/2.

En la figura 9 se muestra para CT26 el gel teñido con Coomassie Blue coloidal (9A), así como también los Western Blot con el suero de conejo hiper-inmune (9B) y pre-inmune (9C). Como puede observarse comparando las figuras 9B y 9C, la mayoría de los “spots” reconocidos por el suero de conejo post-inmune no se corresponden con los “spots” reconocidos por el suero de conejo pre-inmune.

Los “spots” observados con el suero post-inmune que no se corresponden con los visualizados con el suero pre-inmune, se identificaron en el gel teñido con Coomassie Blue coloidal (9A) y se escindieron del gel para su análisis por espectrometría de masa. Estos “spots” tienen un peso molecular aproximado de 80 (1), 43 (2), 40 (3 y 4), 13 (5) y 35 KDa (6); y de punto isoeléctrico aproximado de 5.6, 6.2, 6.3, 6.4, 6.2 y 7, “spots” 1-6 respectivamente. Algunos de dichos “spots” coinciden con el peso molecular de bandas observadas en el Western Blot monodimensional (8B).

Identificación de Antígenos Involucrados en la Reactividad Cruzada entre *Echinococcus granulosus* y células CT26 y LL/2. Sofía Russo

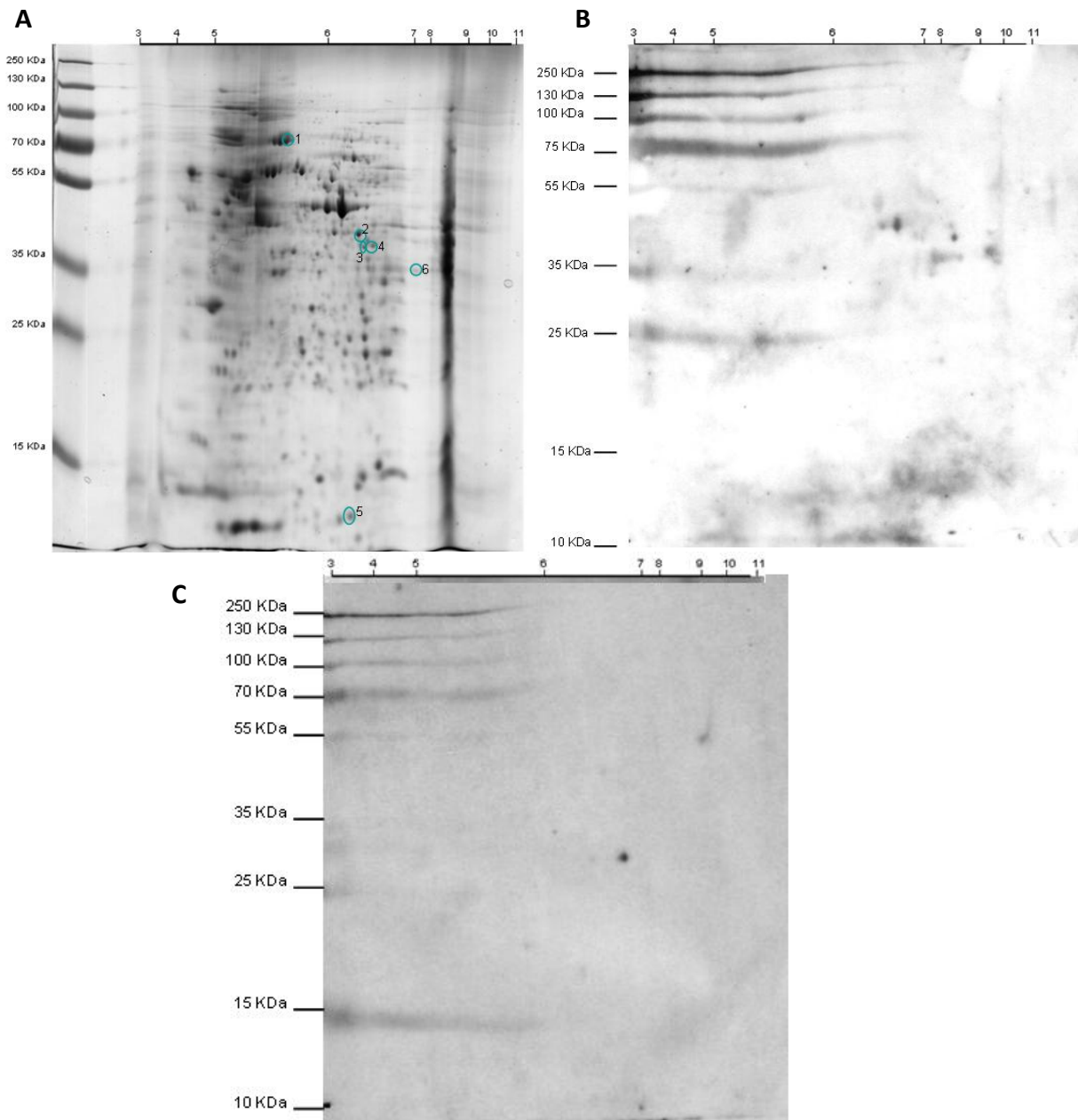
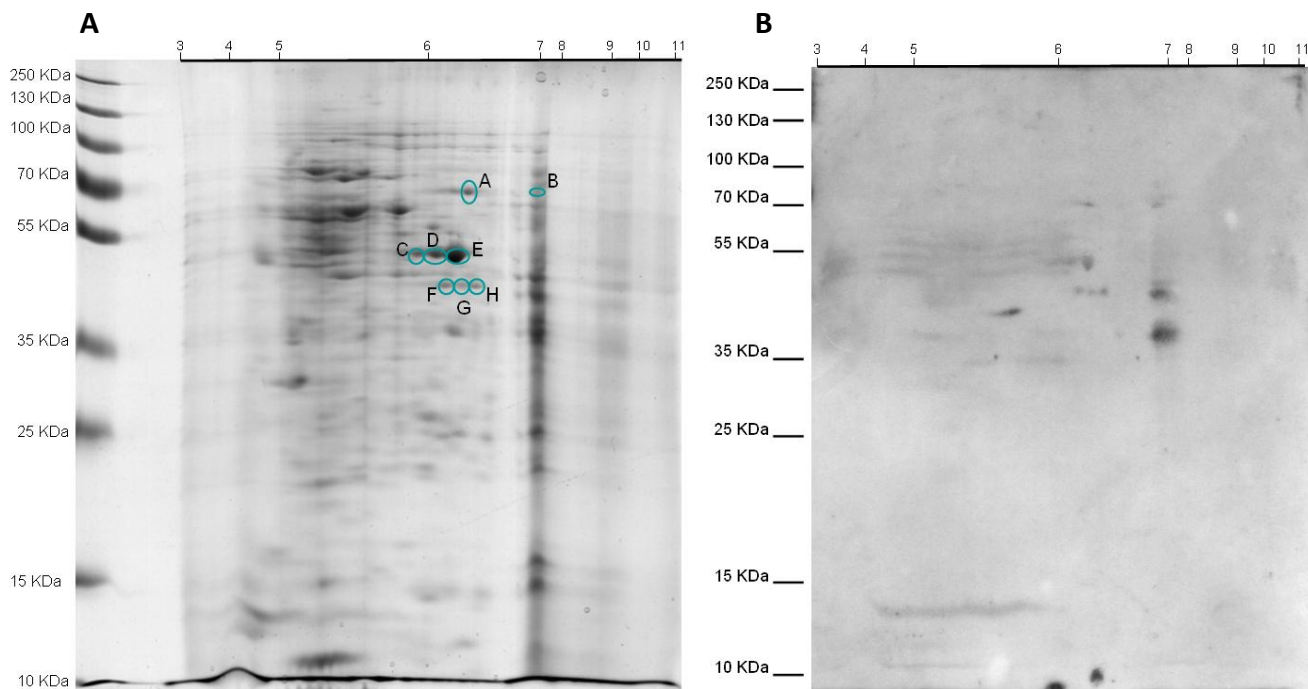


Figura 9. Electroforesis bidimensional y Western Blot de CT26. (A) Gel teñido con Coomassie Blue coloidal. Los “spots” señalados fueron escindidos del gel y analizados por espectrometría de masa. Se muestra el Western Blot de la electroforesis bidimensional de CT26, utilizando el suero de conejo post-inmune, tiempo de exposición 5 minutos (B), y pre- inmune, tiempo de exposición 10 minutos (C). El patrón observado con el suero post-inmune es diferente al observado con el suero pre-inmune.

En la figura 10 se muestra el gel teñido con Coomasie Blue coloidal de la electroforesis bidimensional de LL/2 (10A), así como también el Western Blot utilizando el suero de conejo post-inmune (10B), y el suero de conejo pre-inmune (10C). Como puede inferirse de la comparación de las figuras 10B y 10C, cuatro de los “spots” visualizados con el suero de conejo hiper-inmune son también visualizados con el suero pre-inmune. Por este motivo, no fueron tomados en cuenta en la identificación de los “spots” reconocidos con el suero post-inmune en el gel teñido con Coomasie Blue coloidal (10A).

Al igual que para CT26, los “spots” identificados en el gel teñido con Coomasie Blue fueron escindidos del gel para su análisis por espectrometría de masa. Dichos “spots” tienen un peso molecular aproximado de 70 (A y B), 50 (C, D y E) y 45 KDa (E, F y G) y punto isoeléctrico aproximado de 6.3, 7, 5.8, 6, 6.2, 6.1, 6.2 y 6.3, “spots” A-G respectivamente.



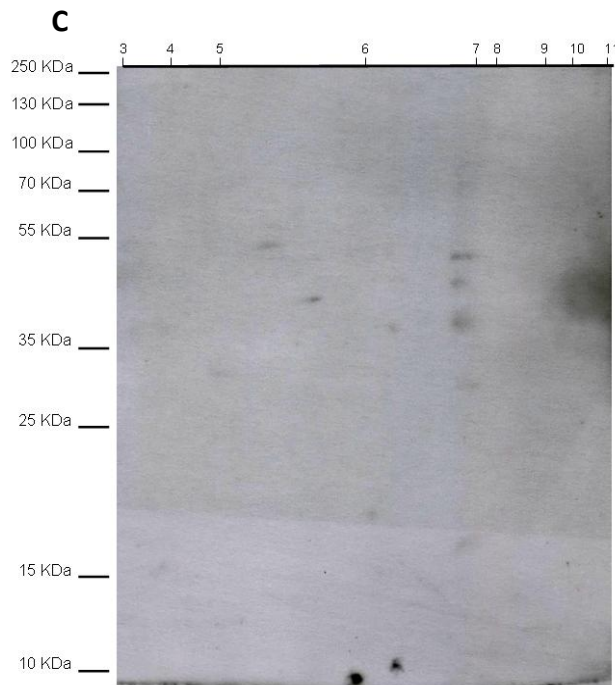


Figura 10. Electroforesis bidimensional y Western Blot de LL/2. (A) Gel teñido con Coomassie Blue coloidal. Los “spots” señalados fueron escindidos del gel y analizados por espectrometría de masa. Se muestra el Western Blot de la electroforesis bidimensional de LL/2, utilizando el suero de conejo post-inmune, tiempo de exposición 5 minutos (B), y pre- inmune, tiempo de exposición 10 minutos (C). El patrón observado con el suero post-inmune es diferente al observado con el suero pre-inmune, visualizándose algunos “spots” en común.

Espectrometría de masa

Utilizando espectrometría de masa MALDI-TOF-TOF logramos identificar algunos de los “spots” escindidos del gel bidimensional de CT26 y de LL/2. La figura 11 muestra a modo de ejemplo el espectro de masa obtenido para la proteína E de LL/2, la cual se pudo identificar de manera estadísticamente significativa como Enolasa 1. Debido a problemas de baja concentración y contaminación, no logramos identificar de manera estadísticamente significativa las proteínas de CT26 2, 4, 5, 6; así como tampoco las proteínas de LL/2 B, D, F, G, H.

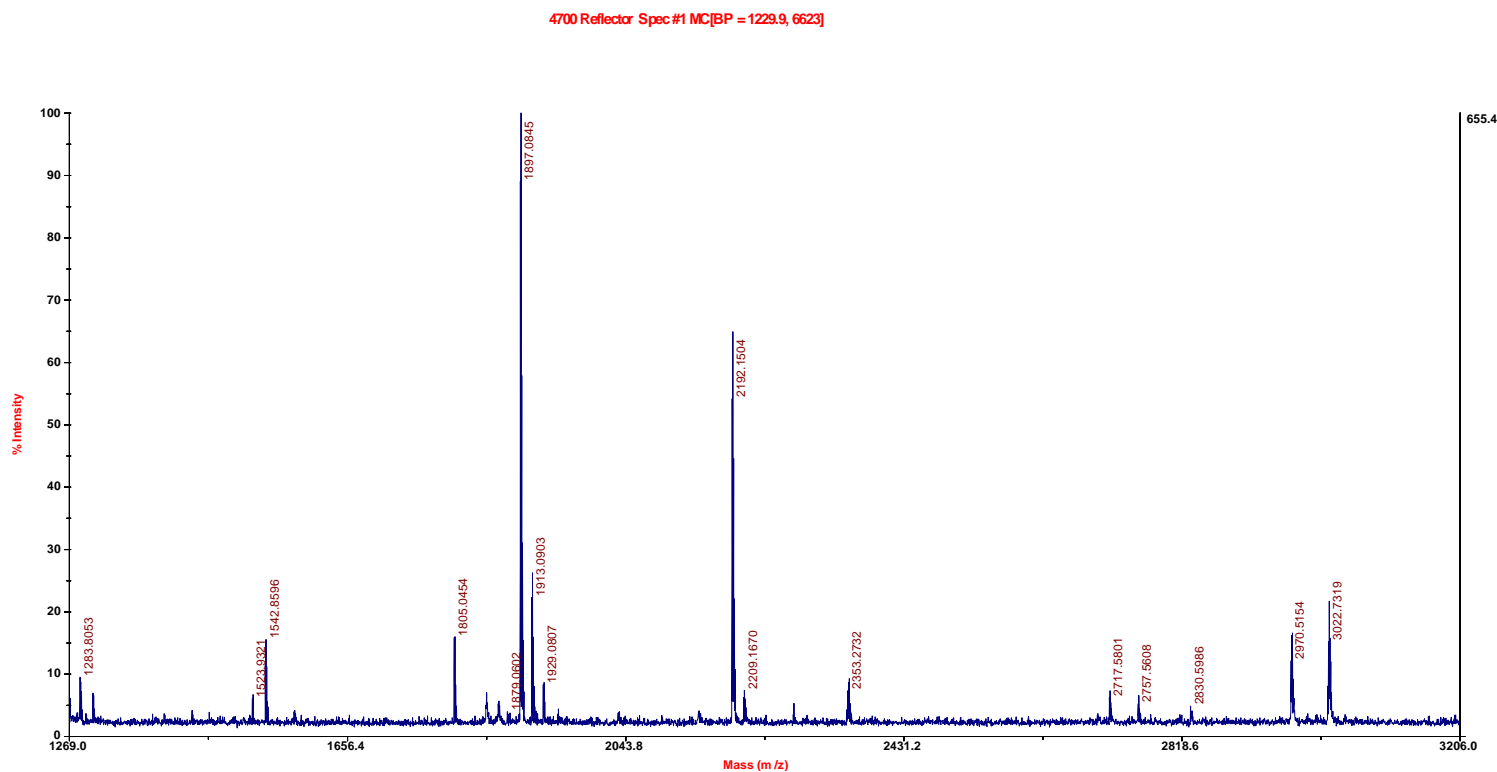


Figura 11. Espectro de masa obtenido para la proteína de LL/2 E identificada de manera estadísticamente significativa como Enolasa 1.

En la Tabla 1 se muestran las proteínas de CT26 que presentan reactividad cruzada con antígenos compartidos de *E. granulosus*. De igual manera se muestran en la Tabla 2 las proteínas de LL/2 identificadas.

Tabla 1. Proteínas identificadas por espectrometría de masa que presentan reactividad cruzada entre *Echinococcus granulosus* y CT26.

	Proteína Identificada	Masa molecular en el gel (KDa)	Masa molecular teórica (KDa)
1	Heat shock protein 9 (Hspa9; Mortalin)	80	70
2	No identificada	43	---
3	Creatina-quinasa tipo M	40	43
4	No identificada	40	---
5	No identificada	13	---
6	No identificada	35	---

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

	Proteína identificada	Masa molecular en el gel (KDa)	Masa molecular teórica (KDa)
A	Fosfoproteína iducida por estrés 1	70	62
B	No identificada	70	---
C	Enolasa 1	50	47
D	No identificada	50	---
E	Enolasa 1	50	47
F	No identificada	45	---
G	No identificada	45	---
H	No identificada	45	---

Los “spots” C y E fueron identificados como Enolasa 1 a pesar de mostrar en el gel un punto isoeléctrico diferente (aproximadamente 5.8 el “spot” C y 6.2 el “spot” E). Esto se debe a que se trata de la misma proteína con modificaciones post-traduccionales (como puede ser la glicosilación) diferentes.

Discusión

La caracterización de los antígenos involucrados en la reactividad cruzada entre los anticuerpos generados contra *E. granulosus* y antígenos expresados por determinadas células tumorales, puede abrir nuevos horizontes en la generación de vacunas anti-tumorales. La vacunación terapéutica contra el cáncer es una forma de complementación de los tratamientos estándares actuales y puede llevar al control a largo plazo del cáncer (Imai & Takaoka, 2006). Numerosas estrategias se encuentran en desarrollo para aumentar la eficacia de estos tratamientos, pero los resultados aún no han sido exitosos. Se han generado vacunas contra el virus del papiloma humano con actividad preventiva para el desarrollo del cáncer de cuello de útero (Garland & Smith, 2010; Szarewski, 2010), pero aún no se dispone de vacuna terapéuticas contra este tipo de tumores. Un aspecto innovador de esta propuesta radica en el desarrollo de un inmunógeno anti-tumoral utilizando moléculas provenientes de un organismo muy alejado de los vertebrados en la escala zoológica. Contra estas moléculas es más difícil que se genere tolerancia inmune, pudiendo ser potentes adyuvantes favoreciendo la mejor presentación de los antígenos asociados a tumor.

Mediante ensayos de Western Blot monodimensionales logramos evidenciar la presencia de anticuerpos anti-líquido hidatídico que reconocen antígenos de las líneas celulares CT26 (línea de cáncer de colon murino) y LL/2 (línea de cáncer de pulmón murino). A pesar de encontrar con el suero pre-inmune reactividad frente a las líneas de células tumorales CT26 y LL/2, el patrón de reconocimiento con el hiper-inmune y con el pre-inmune fue diferencial. Este patrón diferencial se observó en forma mucho más clara en el Western Blot bidimensional. Por lo tanto, estos hallazgos muestran que existe reactividad cruzada entre los antígenos de CT26 y LL/2 con antígenos de *Echinococcus granulosus*.

La identificación de los antígenos de CT26 y LL/2 que presentan reactividad cruzada con antígenos de *E. granulosus* es de gran relevancia, ya que podrían ser blanco de nuevas terapias contra el cáncer. Mediante análisis por espectrometría de masa de los “spots” reconocidos por

el suero post-inmune y no por el pre-inmune, pudimos identificar algunas proteínas de CT26 y LL/2 que estarían sujetas a reactividad cruzada con antígenos de *E. granulosus*.

Por otra parte, identificamos a la proteína Mortalin (también conocida como Hsp 70) en CT26. La proteína Mortalin se encuentra expresada en la mayoría de los tipos celulares y tejidos (Kaul et al, 1997), se cree que se encuentra involucrada en funciones esenciales. A partir de su localización mitocondrial se predijo que algunas de estas funciones pueden incluir la importación y biogénesis mitocondrial (Geissler et al, 2001). Ha sido reportado que muchas de las células tumorales humanas presentan un alto nivel de expresión de Mortalin (Kaul et al, 1998). Varias observaciones sugieren que Mortalin se encuentra involucrada en la transformación de células normales a células tumorales, ya que presenta múltiples funciones relevantes al control de la proliferación celular y tumorigénesis (Wadhwa et al, 2002). Llamativamente, Mortalin y p53 colocalizan en las células humanas transformadas, pero no en las normales. Por lo tanto en las células tumorales Mortalin puede interactuar con p53 promoviendo su secuestro en el citoplasma, y de esta manera inhibir su actividad nuclear (Utomo et al, 2012). Todas estas observaciones sugieren que esta proteína puede ser blanco de terapias contra el cáncer. La proteína Mortalin de ratón presenta una identidad de un 60% con la Hsp70 de *E. granulosus*, lo que estaría explicando la reactividad cruzada entre antígenos de CT26 y de *E. granulosus* observada en nuestro estudio.

En CT26 también identificamos la proteína Creatina-quinasa tipo M, la cual es una enzima ubicua que cataliza la reacción de transfosforilación reversible entre el ATP y la creatina, generando ADP y fosfocreatina. Esta enzima juega un rol clave en el metabolismo energético de células con demanda energética elevada y fluctuante. Se ha reportado el incremento de la actividad de la Creatina-quinasa en carcinomas mamarios (Durany et al, 2000). Al realizar un BLAST de la secuencia proteica de la Creatina-quinasa tipo M de ratón con las secuencias proteicas de *Echinococcus granulosus* presentes en el banco de datos del NCBI, no se encontró una proteína con un porcentaje de identidad significativa.

También identificamos la proteína Enolasa 1 (ENO 1) en LL/2. Además de convertir 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato en la vía glicolítica, hay evidencias de que ENO 1 también se encuentra involucrada en otras actividades biológicas y se encuentra expresada en la mayoría de los tejidos adultos. ENO 1 también es expresada en la superficie celular y funciona como un fuerte receptor de unión a plasminógeno, que podría estar involucrado en la fibrinólisis local y contribuir a la invasión tumoral (Redlitz et al, 1995). Se ha señalado a la ENO 1 como un autoantígeno en pacientes con cáncer de pulmón a células no pequeñas (NSCLC), y se ha demostrado que su nivel de expresión se encuentra correlacionado con el pronóstico y la recurrencia de la enfermedad (Chang et al, 2006). Tanto en un modelo animal en ratones como en pacientes con NSCLC portadores de cáncer de pulmón a células pequeñas (SCLC) y con cáncer de mama; se ha observado que los niveles de anticuerpos anti-enolasa son significativamente menores a los del control y a los de los pacientes sanos (Shin et al, 2010). Esta supresión de la respuesta inmune humoral a ENO 1 podría estar asociada a la progresión maligna del cáncer de pulmón y de mama (Shin et al, 2010).

Se ha hallado enolasa en *E. granulosus*, tanto en el líquido hidatídico como en protoscolex (Lorenzatto et al, 2012; Gan et al, 2010), siendo el porcentaje de identidad con la ENO 1 de ratón de un 73%. Esto explicaría la presencia de anticuerpos con reactividad cruzada entre antígenos de *Echinococcus granulosus* y la línea de cáncer de pulmón murino LL/2.

Por último identificamos la fosfoproteína inducida por estrés 1 (STIP1) en la línea tumoral LL/2. La proteína STIP1 no posee dominio transmembrana ni péptido señal, por lo que se la consideraba una proteína citoplasmática (Lässle et al, 1997). Posteriormente fue demostrado que STIP1 puede localizarse en la superficie celular o ser secretada fuera de la célula (Wang et al, 2010). La forma extracelular de STIP 1 puede unirse a proteínas de prion en la superficie celular y de esta manera inducir señales neuroprotectoras que rescatan a la célula de la apoptosis (Roffé et al, 2010). Por otro lado, en células de glioblastoma la forma extracelular de STIP 1 parece disparar vías de señalización que promueven la proliferación celular (Caetano et al, 2008). Se ha propuesto que la forma intracelular de STIP1 suprimiría

levemente el progreso de la célula en el ciclo celular a través de una interacción inhibitoria con HSP90 (Tsai et al, 2012). Sin embargo, la forma secretada se uniría a receptores de membrana celular, como ALK2 (del acrónimo en inglés “activin A receptor, type II-like kinase 2”) activando la vía de señalización SMAD, que a su vez lleva a la activación transcripcional de ID3 (inhibidor de unión al ADN 3), resultando en la promoción de la proliferación celular (Tsai et al, 2012). Al igual que para la creatina-quinasa tipo M, no se encontró en *Echinococcus granulosus* una proteína de secuencia peptídica similar a la fosfoproteína inducida por estrés 1 de ratón.

En conclusión, en este trabajo obtuvimos las primeras evidencias que confirman la existencia de reactividad cruzada entre antígenos de *Echinococcus granulosus* y de las líneas tumorales CT26 y LL/2. Por otra parte identificamos a Mortalin y Creatina-quinasa tipo M en la línea de cáncer de colon murino CT26 que presentan reactividad cruzada con antígenos de *E. granulosus*. Mientras que en la línea de cáncer de pulmón murino LL/2 se identificaron la Enolasa 1 y la fosfoproteína inducida por estrés 1, que presentan reactividad cruzada con antígenos de *E. granulosus*. Como perspectiva inmediata nos proponemos completar la caracterización de las otras proteínas ya identificadas por electroforesis bidimensional, pero con material insuficiente para su análisis en espectrometría de masas. Los resultados obtenidos en este trabajo aportan datos interesantes que pueden llevar al desarrollo de nuevas terapias antitumorales, utilizando los antígenos identificados que presentan reactividad cruzada entre *E. granulosus* y células tumorales.

Referencias Bibliográficas

- Abbas A.K., Lichtman A.H. & Pillai S. (2010)** Cellular and Molecular Immunology. *Saunders Elsevier*. 6th Edition
- Abdel M.M., Hassan A. & El-Sewedy S. (2000)**. Human bladder cancer, schistosomiasis, N-nitroso compounds and their precursors, *International Journal of Cancer*, 88:682-683
- Akgül H., Tez M., Unal A.E., Keskek M., Sayek I. & Ozcelik T. (2003)** *Echinococcus* against cancer: why not? *Cancer*, 98:1999-2000
- 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. *Exp Parasitology* 98:100-109
- Atayde V.D., Jasiulionis M.G., Cortez M. & Yoshida N. (2008)**. A recombinant protein based on *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp82 induces apoptotic cell death in melanoma cells, *Melanoma Research*, 18:172-183
- Bhatia A. & Kumar Y. (2011)** Cancer-Immune Equilibrium: Questions Unanswered. *Cancer Microenvironment*, 4:209-217
- Brockhausen I. (2006)** Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO reports*, 7: 599-604.
- Burnet F.M. (1970)** The concept of immunological surveillance. *Progress in Experimental Tumor Research*, 13: 1-27
- Caetano F.A., Lopes M.H., Hajj G.N., Machado C.F., Pinto Arantes C., Magalhaes A.C., Vieira M.P., Américo T.A., Massensini A.R., Priola S.A., Vorberg I., Gomez M.V., Linden R., Prado V.F., Martins V.R. & Prado M.A. (2008)** Endocytosis of prion protein is required for ERK1/2 signaling induced by stress-inducible protein 1. *J. Neurosci.* 28:6691-66702
- Casaravilla C., Malgor R. & Carmona C. (2003)** Characterization of carbohydrates of adult *Echinococcus granulosus* by lectin-binding analysis. *Journal of Parasitology*, 89(1): 57-61.

Chang G.C., Liu K.J., Hsieh C.L., Hu T.S., Charoenfuprasert S., Liu H.K., Luh K.T., Hsu L.H., Wu C.W., Ting C.C., Chen C.Y., Chen K.C., Yang T.Y., Chou T.Y., Wang W.H., Whang-Peng J. & Shih N.Y. (2006) Identification of alpha-enolase as an autoantigen in lung cancer: its overexpression is associated with clinical outcomes. *Clin Cancer Res.* 12:5746-54

Chen L., He Z., Qin L., Li Q., Shi X., Zhao S., Chen L., Zhong N. & Chen X. (2011) Antitumor Effect of Malaria Parasite Infection in a Murine Lewis Lung Cancer Model through Induction of Innate and Adaptive Immunity. *PLoS ONE*, 6: e24407

Chen M.C. & Mott K.E. (1989). Progress in the assessment of morbidity due to *Schistosoma haematobium*: A review of the recent literature, *Tropical Diseases Bulletin*, 48:2643-2648

Chow M.T., Möller A. & Smyth M.J. (2012) Inflammation and immune surveillance in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 22: 23-32

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

Darzynkiewicz Z. (2006) Will cancer immunotherapy fail? *Scientist*, 20:14

Del Brutto O.H. (2005) *Taenia* (including cysticercosis) and hidatidid disease. *Medicine*, 33: 70-73

Dimberu P.M. & Leonhardt R.M. (2011) Cancer immunotherapy takes a multi-faceted approach to kick the immune system into gear. *Yale J Biol Med.* 84: 371-80

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., Koebel C.M. & Schreiber R.D. (2006) Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature Reviews Immunology*, 6: 836-848

Durany N., Joseph J., Jimenez O.M., Climent F., Fernández P.L., Rivera F. & Carreras J. (2000) Phosphoglycerate mutase, 2,3-bisphosphoglycerate phosphatase, creatine kinase and enolase activity and isoenzymes in breast carcinoma. *British Journal of Cancer.* 82:20-27

Eckert J. & Deplazes P. (2004) Biological, Epidemiological, and Clinical Aspects of Echinococcosis, a Zoonosis of Increasing Concern. *Clinical Microbiology Reviews*, 17: 107-135

Ehrlich P. (1909) Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, 5:273-290

Ferguson A.R. (1911). Associated bilharziasis and primary malignant disease of the urinary bladder with observations on a series of forty cases, *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 16: 76-94

Freire T., Casaravilla C., Carmona C. & Osinaga E. (2003a). Mucin type O-glycosylation 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., 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

Gan W., Zhao G., Xu H., Wu W., Du W., Huang J., Yu X. & Hu X. (2010) Reverse vaccinology approach identify an *Echinococcus granulosus* tegumental membrane protein enolase as vaccine candidate. *Parasitol Res.* 106: 873-82

García S.B., Aranha A.L., García 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? *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 45: 9-93.

Garland S.M. & Smith J.S. (2010) Human papillomavirus vaccines: current status and future prospects. *Drugs*; 70: 1079–98.

Geissler A., Rassow J., Pfanner N. & Voos W. (2001) Mitochondrial import driving forces: enhanced trapping by matrix hsp70 stimulates translocation and reduces the membrane potential dependence of loosely folded preproteins. *Mol. Cell. Biol.* 21: 7097-7104

Gentile J. & Gentile G. (1994). Implications for the involvement of the immune system in parasite associated cancers. *Mutat Res* 305:315-320.

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 in *Trichinella spiralis*. *Experimental Parasitology* 127: 784-788.

- Grivennikov S.I., Greten F.R. & Karin M. (2010)** Immunity, Inflammation and Cancer. *Cell*, 140: 883-899
- 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.
- Herrera L.A., Benitez-Bribiesca L., Mohar A. & Ostrosky-Wegman P. (2005).** Role of infectious diseases in human carcinogenesis, *Environ Mol Mutagen*, 45:284-303.
- Imai K. & Takaoka A. (2006).** Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6:714-27
- Kaul S.C., Duncan E.L., Englezou A., Takano S., Reddel R.R., Mitsui Y. & Wadhwa R. (1998)** Malignant transformation of NIH 3T3 cells by overexpression of mot-2 protein. *Oncogene*. 17:907-911
- Kaul S.C., Matsui M., Takano S., Sugihara T., Mitsui Y. & Wadhwa R. (1997)** Expression analysis of mortalin, a unique member of the Hsp70 family of proteins, in rat tissues. *Exp. Cell Res.* 232:56-63
- Kim J.O., Jung S.S., Kim S.Y., Kim T.Y., Shin D.W., Lee J.H. & Lee Y.H. (2007)** Inhibition of Lewis Lung Carcinoma Growth by *Toxoplasma gondii* through Induction of Th1 Immune Responses and Inhibition of Angiogenesis. *J Korean Med Sci*, 22: S38-46
- Kindt T.J., Osborne B.A. & Goldsby R.A. (2006)** Kuby Immunology. *W. H. Freeman & Company*. 6th Edition
- Koebel C.M., Vermi W., Swann J.B., Zerafa N., Rodig S.J., Old L.J., Smyth M.J. & Schreiber R.D. (2007)** Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*. 450:903-907
- Larrieu E., Belloto A., Arambulo P. & Tamayo H. (2004)** Echinococcosis quística: epidemiología y control en América del Sur. *Parasitol Latinoam*, 59: 82 – 89
- Lässle M., Blatch G.L., Kundra V., Takatori T. & Zetter B.R. (1997)** Stress-inducible, murine protein mSTI1. Characterization of binding domains for heat shock proteins and in vitro phosphorylation by different kinases. *J. Biol. Chem.* 272:1876-1884
- Lorenzatto K.R., Monteiro K.M., Paredes R., Paludo G.P., da Fonsêca M.M., Galanti N., Zaha A. & Ferreira H.B. (2012)** Fructose-bisphosphate aldolase and enolase from *Echinococcus granulosus*:

Genes, expression patterns and protein interactions of two potential moonlighting proteins. *Gene*. 506: 76-84

Martin D. & Gutkind J.S. (2008). Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer, *Oncogene*, 27:s31-42

Martins I., Kepp O., Galluzzi L., Senovilla L., Schlemmer F., Adjemian S., Menger L., Michaud M., Zitvogel L. & Kroemer G. (2010) Surface-exposed calreticulin in the interaction between dying cells and phagocytes. *Ann N Y Acad Sci*, 1209:77-82

McLaughlin-Drubin M.E. & Munger K. (2008). Viruses associated with human cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1782: 127-50

McManus D.P., Zhang W., Li J. & Bartley P.B. (2003) Echinococcosis. *Lancet*, 362: 1295- 304

Melleman I., Coukos G., Dranoff G. (2011) Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*, 480: 480-489

Molina M.C., Ferreira V., Valck C., Aguilar L., Orellana J., Rojas A., Ramirez G., Billetta R., Schwaeble W., Lemus D. & Ferreira A. (2005). An in vivo role for *Trypanosoma cruzi* calreticulin in antiangiogenesis, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 140:133-140

Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. (2011). Janeway's Immunobiology. *Garland Science*. 8th Edition

Myc L.A., Gamian A. & Myc A. (2011) Cancer vaccines. Any Future? *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 59: 249-259

Nyame K., Cummings R.D. & Damian R.T. (1987) *Schistosoma mansoni* synthesizes glycoproteins containing terminal O-linked N-acetylglucosamine residues, *The Journal of biological chemistry*, 262:7990-7995

Old L.J. & Boyse E.A. (1964) Immunology of experimental tumors, *Annual Review of Medicine*, 15: 167-186

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

- 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*, 22:737-740
- Osinaga E. (2007).** Expression of cancer-associated simple Mucin-type O-glycosylated Antigens in Parasites. *IUVMV Life*, 59:269-273.
- Pardoll D.M. (1998)** Cancer vaccines. *Nat Med*, 4:525-531
- Parra J.C., Gazzinelli G., Goes AM., Moyes R.B., Rocha R., Colley D.G. & Doughty B.L. (1991)** Granulomatous hypersensitivity to *S. mansoni* egg antigens in human schistosomiasis. *Journal of Immunology*, 147:3949-3954
- Peto J. (2001)** Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature*, 411:390-395
- Pisani P., Parkin D.M., Munoz N. & Ferlay J. (1997).** Cancer and infection: Estimates of the attributable fraction in 1990, *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 6:387-400
- Quezada S.A., Peggs K.S., Simpson T.R. & Allison J.P. (2011)** Shifting the equilibrium in cancer immunoediting: from tumor tolerance to eradication. *Immunological Reviews*, 241: 104-118
- Redlitz A., Fowler B.J., Plow E.F. & Miles L.A. (1995)** The role of an enolase-related molecule in plasminogen binding to cells. *Eur J Biochem*. 227:407-15
- Renkvist N., Castelli C., Robbins P.F. & Parmiani G. (2001)** A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol Immunother*, 50:3-15
- Riganti M., Pungpak S., Punpoowong B., Bunnag D. & Harinasuta T. (1989)** Human pathology of *Opisthorchis viverrini* infection: A comparison of adults and children. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 20:95-100
- Roffé M., Beraldo F.H., Bester R., Nunziante M., Bach C., Mancini G., Glich S., Vorberg I., Castiho B.A., Martins W.R. & Hajj G.N. (2010)** Prion protein interaction with stress-inducible protein 1 enhances neuronal protein synthesis via mTOR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107:13147-131752

Shih N.Y., Lai H.L., Chang G.C., Lin H.C., Wu Y.C., Liu J.M., Liu K.J. & Tseng S.W. (2010) Anti- α -enolase autoantibodies are down-regulated in advance cancer patients. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 40(7):663-669

Singh P.K. & Hollingsworth M.A. (2006) Cell surface-associated mucins in signal transduction. *Trends in Cell Biology*, 16: 467-476.

Szarewski A. (2010). HPV vaccine: Vervarix, *Expet Opin Biol Ther*, 10:477-487

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: 73-81.

Topalian S.L., Weiner G.J. & Pardoll D.M. (2011) Cancer immunotherapy comes of age. *J Clin Oncol*, 29: 4828-4836

Tsai C.L., Tsai C.N., Lin C.Y., Chen H.W., Lee Y.S., Chao A., Wang T.H., Wang H.S. & Lai C.H. (2012) Secreted stress-induced phosphoprotein 1 activates the ALK2-SMAD signalling pathways and promotes cell proliferation of ovarian cancer cells. *Cell Reports*. 2: 1-11

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. *Exp Parasitol*, 200:129-36.

Utomo D.H., Widodo N. & Rifa'i M. (2012) Identifications small molecules inhibitor of p53-mortalin complex for cancer drug using virtual screening. *Bioinformation*. 8:426-9

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

Viranuvatti V. & Mettiyawongse S. (1953). Observations on two cases of opisthorchiasis in Thailand, *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 43:291-293

Wadhwa R., Taira K. & Kaul S.C. (2002) Mortalin: a potential candidate for biotechnology and biomedicine. *Histol Histopathol*. 17: 1173-1177

Waldmann T.A. (2003) Immunotherapy: past, present and future. *Nat Med*, 9:269-277

Wang T.H., Chao A., Tsai C.L., Chang C.L., Chen S.H., Lee Y.S., Chen J.K., Lin Y.J., Chang P.Y., Wang C.J., Chao A.S., Chang S.D., Chang T.C., Lai C.H. & Wang H.S. (2010) Stress-induced phosphoprotein 1 as a secreted biomarker for human ovarian cancer promotes cancer cell proliferation. *Mol. Cell. Proteomics*. 9: 18-73-1884

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

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