



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



INSTITUT PASTEUR
DE MONTEVIDEO

IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS DE REACTIVIDAD CRUZADA ENTRE *TRYPANOSOMA CRUZI* Y CÉLULAS TUMORALES LL/2

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

ALINA BROSQUE MARKENSON

Orientador: Dr. Álvaro Pittini

Co-Orientador: Dr. Eduardo Osinaga

Laboratorio de Glicobiología e Inmunología Tumoral
Institut Pasteur de Montevideo

Contenido

RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Cáncer.....	4
1.2 Inmunidad y cáncer	7
1.3 Teoría de inmunoección de tumores.....	9
1.3.1 Eliminación.....	9
1.3.2 Equilibrio	12
1.3.3 Escape.....	13
1.4 Inmunoterapia antitumoral	16
1.5 Relación cáncer - parásito	19
1.6 <i>Trypanosoma cruzi</i> y cáncer.....	23
2. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo general	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1 Líneas celulares	30
3.2 Extractos celulares	30
3.3 Cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
3.4 Extractos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
3.5 Cuantificación de proteínas	32
3.6 Suero de conejo anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
3.7 Inmunohistoquímica	33
3.8 Inmunofluorescencia indirecta	34
3.9 Citometría de flujo	35
3.10 Western blot monodimensional.....	36
3.11 Electroforesis bidimensional y Western blot.....	37

3.12 Espectrometría de masas	39
3.13 Ensayo de lectinas ligado a enzimas	40
3.14 Lectin blot	41
4. RESULTADOS	42
4.1 Evaluación del reconocimiento específico de antígenos tumorales presentes en la línea celular LL/2 por un suero anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> producido en conejo, mediante abordajes técnicos complementarios:	42
4.1.1 Inmunohistoquímica	42
4.1.2 Inmunofluorescencia indirecta.....	43
4.1.3 Citometría de flujo	44
4.1.4 Western blot monodimensional	46
4.2 Identificación de antígenos de reactividad cruzada por espectrometría de masas.....	47
4.2.1 Electroforesis bidimensional y western blot	47
4.2.2 Espectrometría de masas	49
4.3 Evaluación de la presencia de motivos carbohidratos compartidos entre <i>Trypanosoma cruzi</i> y células LL/2 mediante el reconocimiento por lectinas.....	51
4.3.1 Ensayo de lectinas ligado a enzimas	51
4.3.2 Lectin blot.....	52
5. DISCUSIÓN	54
5.1 Evaluación del reconocimiento específico de antígenos tumorales presentes en la línea celular LL/2 por un suero anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> producido en conejo, mediante abordajes técnicos complementarios	54
5.2 Identificación de antígenos de reactividad cruzada por espectrometría de masas.....	56
5.3 Evaluación de la presencia de motivos carbohidratos compartidos entre <i>Trypanosoma cruzi</i> y células LL/2, mediante el reconocimiento por lectinas.....	67
6. CONCLUSIONES	72
7. REFERENCIAS	73

RESUMEN

El cáncer constituye la segunda causa de muerte a nivel mundial. Dada su elevada incidencia y gran mortalidad, actualmente existe la necesidad de nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas para la detección precoz y el tratamiento de ésta enfermedad. En este sentido, el conocimiento de que el sistema inmune tiene la capacidad de reconocer, destruir, y modular la inmunogenicidad del cáncer abrió nuevos horizontes de terapias para el control de esta enfermedad. Específicamente, en la última década, se han realizado grandes avances en inmunoterapias para el cáncer, basadas principalmente en la utilización de anticuerpos monoclonales capaces de potenciar la respuesta inmune contra ciertos tumores. Sin embargo, otras estrategias como el desarrollo de vacunas terapéuticas antitumorales, no han generado aún un impacto significativo a nivel de oncología clínica.

Más del 15% de los cánceres se originan a partir de agentes infecciosos. Sin embargo, datos epidemiológicos muestran que existe una correlación inversa entre la incidencia de ciertas infecciones parasitarias y el desarrollo de cáncer en humanos. Basándose en estos resultados, nuestro grupo ha identificado en parásitos diferentes antígenos que se expresan con alta especificidad en cáncer, generando la hipótesis de que estos últimos podrían inducir respuestas inmunes cruzadas efectivas contra el cáncer.

En efecto, nuestro grupo ha demostrado que los anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) presentan reacción inmune cruzada con células tumorales tanto en modelos animales como en muestras humanas, y que extractos de *T. cruzi* son capaces de inducir respuestas inmunes antitumorales protectoras en distintos modelos murinos de cáncer experimental, entre los que se destaca el carcinoma pulmonar de Lewis (LL/2), utilizado en el presente trabajo. Además, en el modelo tumoral LL/2, datos preliminares muestran que la oxidación de los azúcares del extracto parasitario disminuye la actividad antitumoral del mismo.

Basado en estos antecedentes, en el presente trabajo se evaluó la reactividad cruzada entre *T. cruzi* y las células tumorales LL/2, demostrando por distintos abordajes técnicos que un suero anti-*T. cruzi* producido en conejo es capaz de reconocer antígenos en LL/2. Asimismo, a través de un abordaje inmuno-proteómico se identificaron 14 proteínas de LL/2 sujetas a reactividad cruzada con *T. cruzi*. Finalmente, se verificó la presencia de motivos carbohidratos compartidos entre *T. cruzi* y LL/2, mediante el reconocimiento por lectinas. Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen a la comprensión del sistema *T. cruzi*-cáncer, a través de la identificación de antígenos involucrados en la reactividad cruzada.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer

El cáncer representa un conjunto de enfermedades en las cuales el organismo produce un exceso de células que no responden a los mecanismos normales de control de crecimiento como consecuencia de la adquisición de mutaciones que perturban los programas de proliferación, diferenciación y apoptosis celular (Goldsby, 2003). De esta manera, se produce un crecimiento descontrolado de células anormales que, a medida que acumulan alteraciones genéticas, generan la aparición de un nuevo fenotipo transformado, y conducen a la formación de un tumor. Estos tumores pueden quedar limitados al sitio de origen o propagarse a distancia, por vía sanguínea o linfática, originando el proceso conocido como metástasis (Fainboim, 2011).

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, constituyendo uno de los desafíos sanitarios más relevantes en la actualidad. Además, la incidencia global del cáncer continúa en aumento, estimándose que el número de nuevos casos pasará de 14 millones en 2012, a más de 20 millones para el año 2030 (Wild, 2014). En particular, el cáncer de pulmón, presenta una muy alta incidencia y mortalidad, siendo la principal causa de muerte por cáncer en 87 países en el caso de los hombres y en 26 países en el caso de las mujeres (Karagas, 2006).

En Uruguay, en hombres, el cáncer de pulmón es el segundo tipo de cáncer más frecuente aunque continúa siendo la principal causa de muerte por esta enfermedad. En cambio, en mujeres, el cáncer de pulmón es el cuarto tipo de cáncer más frecuente (luego del cáncer de mama, colon-recto y cérvix) y ocupa la tercera causa de mortalidad por cáncer (figura 1) (Barrios, 2015.)

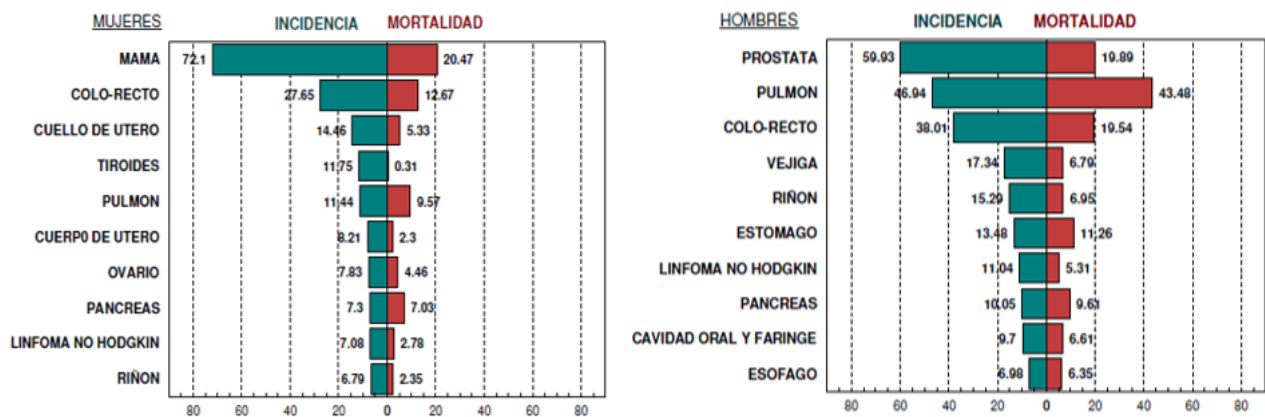


Figura 1. Datos epidemiológicos del cáncer en Uruguay 2009-2013. Se muestra la tasa de incidencia y mortalidad (casos x 100.000) para los principales tipos de cáncer, en hombres y mujeres por separado. Tomado de Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer (Barrios, 2015).

En el año 2000, Hanahan y Weinberg definieron seis características distintivas que son adquiridas en el proceso de transformación de células normales a células cancerosas, a las que denominaron como *hallmarks* del cáncer (figura 2A). Así, los autores lograron resumir la complejidad del cáncer en unas pocas características fundamentales, que incluyen: la resistencia a la muerte celular, el mantenimiento de la señalización proliferativa, la evasión de las señales supresoras del crecimiento, la inmortalidad replicativa, la inducción del proceso de angiogénesis y la capacidad de invadir otros tejidos para generar metástasis (Hanahan & Weinberg 2000).

En una revisión actualizada en 2011, los autores plantean a la inestabilidad genómica y la inflamación crónica como dos características que subyacen a la adquisición de estos *hallmarks* por las células tumorales (figura 2B). Los autores proponen que la inestabilidad genómica acelera el proceso de adquisición de los *hallmarks*, mientras que también sugieren que la inflamación crónica favorece muchas de estas capacidades distintivas, promoviendo la progresión tumoral por sobre la eliminación (Hanahan & Weinberg, 2011). A su vez, en esta revisión, también se proponen dos nuevos *hallmarks* emergentes (figura 2B). El primero de ellos

corresponde a la reprogramación del metabolismo energético celular, proceso a través del cual se reemplaza el programa metabólico que opera en la mayoría de los tejidos normales, para apoyar la proliferación celular sostenida (Hanahan & Weinberg, 2011). El segundo es la inmunoevasión, es decir, la capacidad de las células tumorales de evadir el ataque de las células del sistema inmune de forma activa (Hanahan & Weinberg, 2011), concepto que se discutirá en profundidad más adelante.

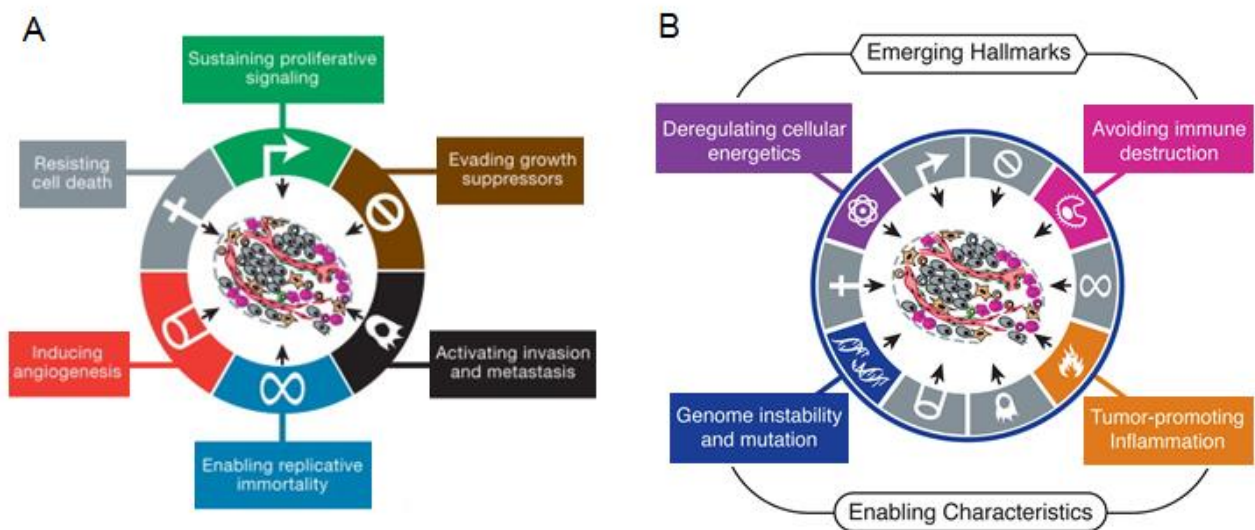


Figura 2. Hallmarks del cáncer. Se observan las seis características distintivas que permiten el crecimiento y la diseminación de células tumorales originalmente descritas por Hanahan & Weinberg (A). Además, se muestran los dos *hallmarks* emergentes y las dos características subyacentes a la adquisición de los *hallmarks*, propuestas por los autores en una revisión actualizada (B). Tomado de Hanahan & Weinberg, 2000 (A) y 2011 (B).

La incorporación de estos nuevos *hallmarks* refleja una transición en el entendimiento de la naturaleza del cáncer. En un comienzo las investigaciones se centraron estrictamente en el estudio de las células tumorales, tomando al cáncer únicamente como una enfermedad genética. Sin embargo, en la actualidad, las investigaciones se han concentrado en la comprensión del cáncer como enfermedad sistémica, donde el foco se expande hacia el estudio del individuo y su interacción

con el tumor, y más específicamente hacia el estudio del microambiente en el que el tumor se desarrolla (Finn, 2012).

La noción de que los múltiples tipos celulares que constituyen el tumor y su microambiente juegan un rol activo en la tumorigénesis es muy reciente, y agrega una dimensión adicional de complejidad para la comprensión de este proceso (Hanahan & Weinberg, 2011).

1.2 Inmunidad y cáncer

A comienzos del siglo XX, Paul Ehrlich propuso por primera vez la idea de que el sistema inmune podría tener un efecto protector frente al cáncer (Ehrlich, 1909). Sin embargo, la falta de herramientas y de conocimientos generales en inmunología, impidieron la comprobación de esta hipótesis en aquel entonces.

El concepto fue reintroducido en la década de 1950 por Frank MacFarlane Burnet y Lewis Thomas, quienes propusieron la hipótesis de la "inmunovigilancia" (Burnet, 1957; Thomas, 1959). De acuerdo con ésta, el sistema inmune tiene la capacidad de detectar y eliminar células transformadas antes de que puedan proliferar e invadir tejidos nuevos. Si bien las primeras evidencias fueron contundentes, cuando la hipótesis se puso a prueba comparando el desarrollo tumoral en ratones atímicos (*nude*) frente a ratones normales, los resultados fueron desalentadores (Stutman, 1974; Stutman, 1975). La incapacidad para observar diferencias entre ambos grupos de ratones, se atribuye a que los primeros no son completamente inmunodeficientes (Kennedy, 1992), cómo se creía en aquel entonces. Estos estudios condujeron al abandono de la hipótesis de la inmunovigilancia durante varios años.

A partir de 1990, el papel del sistema inmune en el control del cáncer recobró interés con la publicación de una serie de estudios que evidenciaron el rol clave del IFN- γ y las células T en la supresión del crecimiento tumoral. En efecto, se demostró

que el bloqueo de IFN- γ favorece en gran medida la aparición de tumores (Dighe, 1994). De forma similar, se probó que los ratones deficientes en el receptor de IFN- γ son mucho más susceptibles a la carcinogénesis química con respecto a los ratones normales (Kaplan, 1998). Asimismo, se observaron resultados semejantes en ratones con deficiencia para los genes de las recombinasas (Rag1/2 $^{-/-}$), los cuales carecen de linfocitos T, B y NKT, cuando fueron expuestos a estímulos carcinogénicos (Shankaran, 2001).

Las evidencias, sin embargo, no se restringen únicamente a modelos murinos. En humanos se ha observado que pacientes inmunosuprimidos, tanto por infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), como por tratamiento con drogas inmunosupresoras luego de someterse a un trasplante, manifiestan una mayor incidencia de cáncer (Dunn, 2004). Estas observaciones, sumadas a otras numerosas evidencias experimentales y clínicas, demostraron que el sistema inmune cumple un papel fundamental para la prevención, limitación y supresión del desarrollo tumoral.

Sin embargo, es importante comprender que la inmunovigilancia representa sólo una dimensión en la compleja relación entre el sistema inmune y el cáncer (Dunn, 2002, 2004; Schreiber, 2004). El diálogo entre el sistema inmune y el tumor es dinámico, lo cual le permite al sistema inmune moldear las propiedades fenotípicas del tumor, y de esta manera seleccionar variantes de células tumorales menos inmunogénicas, capaces de impedir el reconocimiento inmunitario. Este proceso de inmunoselección permite explicar la aparente paradoja de la formación de tumores en individuos completamente inmunocompetentes (Shankaran, 2001).

La comprensión de la función dual del sistema inmune, ya sea reprimiendo la aparición de células transformadas y/o promoviendo la progresión tumoral, condujo a la redefinición de la hipótesis de inmunovigilancia en la "Teoría de inmunoedición de

tumores" (Dunn, 2002; 2004). Según esta teoría, el proceso de inmunoección de tumores transcurre en tres fases, conocidas como las "tres E": Eliminación, Equilibrio y Escape (figura 3) (Schreiber, 2011).

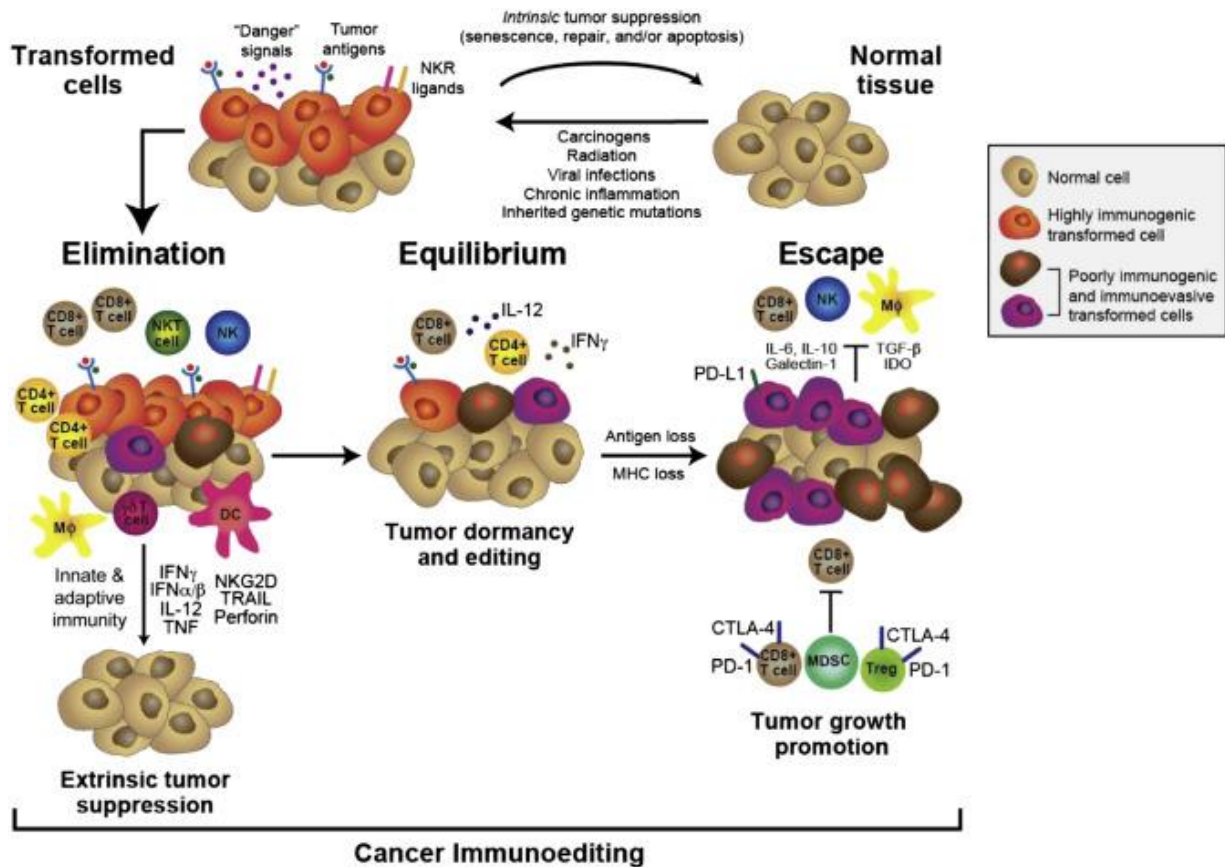


Figura 3. Teoría de inmunoección del cáncer. La inmunoección del cáncer transcurre en tres fases secuenciales: eliminación, equilibrio y escape. En la fase de eliminación, la inmunidad innata y adaptativa trabajan en conjunto para destruir los tumores en desarrollo. Durante la fase de equilibrio, el crecimiento tumoral se previene mediante mecanismos inmunológicos y se edita la inmunogenicidad del tumor. Finalmente, algunas de las células tumorales pueden entrar en la fase de escape, en la que sortean los mecanismos efectorres del sistema inmune y emergen para causar una enfermedad clínicamente aparente. Tomado de Schreiber, 2011.

1.3 Teoría de inmunoección de tumores

1.3.1 Eliminación

La fase de eliminación representa la visión contemporánea de la hipótesis original de inmunovigilancia, en donde el sistema inmune innato y adaptativo actúan

en conjunto para erradicar el tumor en desarrollo antes de que se vuelva clínicamente aparente. El comienzo de esta fase requiere señales de estrés o daño celular, generadas en el microambiente tumoral, que contribuyen al establecimiento de una reacción proinflamatoria y promueven el desencadenamiento de una respuesta inmune (Schreiber, 2011).

Los componentes de la inmunidad innata pueden detectar a las células tumorales de forma directa mediante sus receptores de reconocimiento de patrones u otras moléculas de superficie celular. Frecuentemente, las células tumorales expresan familias de genes vinculados a estrés celular, como MICA y MICB, que funcionan como ligandos para los receptores NKG2D, expresados por las células *Natural Killer* (NK), entre otras (Diefenbach, 2002). Las células NK también monitorean la pérdida de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I (MHC I) en la superficie de las células tumorales, lo que ocurre comúnmente durante el proceso de carcinogénesis (Karre, 2002). La actividad de las células NK está regulada por un balance entre señales provenientes de receptores activadores, que reconocen moléculas asociadas a estrés celular, y receptores inhibitorios que reconocen moléculas de expresión normal en las células como las MHC de clase I (William, 2008; Goldsby, 2003). Una vez activadas, las células NK son capaces de inducir la apoptosis de sus células blanco mediante la liberación de gránulos conteniendo moléculas de perforina y granzima, o a través de interacciones entre receptores de membrana como Fas/Fas-L. Por otra parte, las células NK también pueden desencadenar su potencial citotóxico frente al reconocimiento de anticuerpos IgG unidos a la superficie de las células tumorales, mecanismo conocido como citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) (Murphy, 2008).

Otras señales de alerta, que también pueden ser reconocidas y mediar la activación de los componentes del sistema inmune innato, son los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, por sus siglas en inglés). Los DAMPs asociados a tumores incluyen el ácido úrico (subproducto del metabolismo tumoral), los productos de degradación de la matriz extracelular y las proteínas de choque térmico (HSPs) liberadas por células tumorales necróticas (Schreiber, 2011). Además, las HSPs pueden actuar como chaperonas para péptidos derivados del tumor, facilitando su captación por células dendríticas (DCs) y macrófagos, a través de sus receptores scavenger o CD91 (Basu, 2001).

Las DCs son células del sistema inmune innato cuyo rol es fundamental para la inducción de una respuesta antitumoral específica. Éstas pueden fagocitar células tumorales apoptóticas a través de sus receptores CD36 e integrina $\alpha\beta 5$. (Albert, 1998). Luego, las DCs procesan este material para presentarlo a través de las moléculas de MHC, al mismo tiempo que aumentan la expresión de moléculas coestimuladoras, como B7-1 y B7-2, y migran a los ganglios regionales para activar linfocitos T tumor-específicos (Banchereau, 1998).

El reconocimiento específico del tumor por el sistema inmune adaptativo, y más específicamente por los linfocitos B y T, depende de la expresión y presentación de neoantígenos tumorales. Los procesos de transformación celular implican alteraciones genéticas que pueden conducir a las células tumorales a expresar moléculas capaces de ser reconocidas por el sistema inmune. Tradicionalmente, aquellos antígenos originados a causa de mutaciones en la región codificante de los genes de la célula tumoral se denominan antígenos específicos de tumor, dado que son expresados exclusivamente por estas células. Otros antígenos, cuya expresión

se ve aumentada en células tumorales pero no se encuentra restringida a las mismas, se denominan antígenos asociados a tumor (Wurz, 2016).

Los antígenos tumorales pueden desencadenar mecanismos que lleven a su eliminación. Por ejemplo, los linfocitos T CD8+ citotóxicos participan en la eliminación de células transformadas al reconocer, mediante sus receptores TCR, antígenos tumorales presentados por moléculas MHC de clase I. Los mecanismos de citotoxicidad empleados por estas células son, en esencia, los mismos que utilizan las NK (Goldsby, 2003). Por su parte, los linfocitos T CD4+, que reconocen antígenos tumorales presentados por moléculas MHC de clase II, también juegan un rol preponderante. Estas células no solamente colaboran en la activación de los linfocitos T CD8+, sino que además contribuyen a la generación de respuestas de anticuerpos (Old, 1998; Sahin, 1995).

Adicionalmente, la liberación local de quimioquinas y de citoquinas proinflamatorias, por células de la inmunidad innata y adaptativa, contribuye a la activación de células efectoras y al reclutamiento de poblaciones celulares adicionales a las proximidades del tumor, facilitando el establecimiento de una respuesta inmune específica (Weinberg, 2007).

1.3.2 Equilibrio

Algunas variantes de células tumorales que sobreviven a la fase de eliminación, pueden entrar en la fase de equilibrio. En esta fase el sistema inmune previene la proliferación de las células tumorales, al mismo tiempo que esculpe su inmunogenicidad (Schreiber, 2011). De esta manera, durante la fase de equilibrio, el sistema inmune mantiene las células tumorales residuales en un estado de quiescencia, en el que pueden permanecer por décadas antes de retomar

eventualmente su crecimiento, ya sea como tumor primario recurrente o cómo metástasis (Aguirre-Ghiso, 2007).

Una de las evidencias más contundentes para la existencia de la fase de equilibrio proviene de experimentos de tumorigénesis primaria en ratones inmunocompetentes, tratados con el carcinógeno metilcolantreno (MCA) (Koebel, 2007). Se demostró que dichos ratones albergaban células cancerosas ocultas por largos períodos de tiempo, ya que una vez depletados de células T e IFN- γ , aparecían rápidamente tumores de alta inmunogenicidad en el sitio de inyección con MCA, incluso cuando no habían desarrollado ningún tumor aparente en un comienzo. En humanos, este fenómeno ha sido observado en algunos casos de trasplantes de órganos sólidos desde donantes con aparente remisión completa del cáncer. Se ha encontrado que pueden existir células tumorales quiescentes en estos órganos que retoman su crecimiento una vez dentro del individuo receptor, cuyo sistema inmune se encuentra deprimido para evitar el rechazo al trasplante (Strauss & Thomas, 2010). Estudios mecanísticos de la fase de equilibrio revelaron que la respuesta adaptativa (específicamente a través de linfocitos T CD4+ y CD8+, IL-12 e IFN- γ) es la responsable de mantener las células tumorales ocultas (Koebel, 2007).

1.3.3 Escape

En la fase de escape, las células tumorales que han adquirido la capacidad de evadir el reconocimiento y/o los mecanismos efectores del sistema inmune, reemergen desarrollando tumores clínicamente detectables. La transición desde la fase de equilibrio a la fase de escape ocurre por varios mecanismos, los cuales pueden implicar cambios tanto a nivel de las células tumorales, como a nivel del propio sistema inmune (Schreiber, 2011).

Entre las estrategias de evasión de las células tumorales, se destacan aquellas alteraciones que conducen a una disminución de su inmunogenicidad. En particular, se ha observado que numerosos tumores exhiben alteraciones en la expresión, el procesamiento y la presentación de antígenos, lo que les permite evitar el reconocimiento por las células inmunes (Drake, 2006). Por ejemplo, ciertos tumores disminuyen la expresión de antígenos inmunodominantes o experimentan procesos de cambio antigénico como consecuencia de la acumulación de mutaciones (Crocì, 2007). Asimismo, muchos tumores manifiestan alteraciones en el inmunoproteasoma o en la vía de presentación de antígenos en el contexto de moléculas MHC de clase I. Estas alteraciones se han observado a nivel de distintas moléculas, incluyendo el transportador del retículo endoplasmático TAP, los componentes del inmunoproteasoma LMP-2 y LMP-7 (Seliger, 2000) o las propias moléculas MHC de clase I (Drake, 2006).

Las células tumorales que disminuyen su expresión de MHC de clase I, continúan siendo susceptibles al ataque de las células NK (William, 2008), a menos que expresen en su superficie moléculas de MHC no clásicas, tales como HLA-G y HLA-E. Estas moléculas se unen a los mismos receptores inhibitorios en las células NK que las MHC de clase I, evitando la liberación de componentes citotóxicos (Sukari, 2016) y, por lo tanto, su expresión constituye otro de los mecanismos de evasión descritos para las células tumorales.

Por otra parte, la célula tumoral también puede desarrollar resistencia a los efectos citotóxicos de las células inmunes. Dicha resistencia puede ser adquirida por la activación de mecanismos antiapoptóticos que incluyen la expresión persistente de factores de transcripción pro-oncogénicos como STAT3, o la expresión de moléculas antiapoptóticas como Bcl-2 (Dunn, 2002; Schreiber, 2011). A su vez, tanto las células

tumorales como las células del estroma, pueden inducir activamente un microambiente inmunosupresor. Este microambiente puede ser generado mediante la secreción de moléculas inmunosupresoras, la depleción de metabolitos esenciales, la expresión de moléculas coestimuladoras con propiedades inhibitorias o el reclutamiento de células con características reguladoras (Rabinovich, 2007).

Dentro los factores inmunosupresores producidos por las células tumorales y del estroma, pueden destacarse el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), la interleuquina 10 (IL-10) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β). El VEGF, producido por una variedad de tumores, inhibe la diferenciación y maduración de células dendríticas (Gabilovich, 1998). Adicionalmente, la citoquina IL-10 también inhibe dicha maduración, y puede reducir la expresión de TAP en las células tumorales. Por su parte, la expresión de TGF- β inhibe la activación, proliferación y diferenciación de linfocitos T (Rabinovich, 2007).

En cuanto a la depleción de metabolitos esenciales, numerosos tumores expresan niveles elevados de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), que cataliza la degradación del triptófano, conduciendo a una depleción local de este aminoácido. Esto puede derivar en el arresto del ciclo celular, o incluso en la muerte por apoptosis, de linfocitos T efectores (Rabinovich, 2007). Por otra parte, varios tipos de tumores se caracterizan por la expresión de moléculas de membrana con capacidad de modular negativamente la actividad del sistema inmune, entre las que se destaca PD-L1. Esta molécula promueve, mediante la unión a su receptor PD-1, el agotamiento o la apoptosis de linfocitos T citotóxicos (Chikuma, 2016).

Muchos tumores poseen la capacidad de reclutar poblaciones celulares con perfil inmunosupresor. Entre las poblaciones involucradas, se ha asociado a los tumores con la expansión, el reclutamiento y la activación de linfocitos T reguladores

(Tregs). Las Tregs se caracterizan por la producción de citoquinas inmunosupresoras como IL-10 o TGF- β , la expresión de moléculas de coestimulación negativa como CTLA-4, PD-1 y PD-L1, y por el consumo de IL-2 (Schreiber, 2011). A través de estos mecanismos los Tregs pueden suprimir la acción de linfocitos T, entre otras poblaciones celulares. El reclutamiento de Tregs a la zona del tumor se propone que es dependiente de la quimioquina CCL22, secretada por las células tumorales y cuyo receptor CCR4, se expresa en los Tregs (Wang & Vella, 2016). Por su parte, las células mieloides supresoras (MDSCs), también contribuyen a generar un ambiente tumoral inmunosupresor, dado que inducen células Tregs, producen TGF- β y depletan o secuestran aminoácidos esenciales para la función de los linfocitos T (Schreiber, 2011).

1.4 Inmunoterapia antitumoral

Como se mencionó anteriormente, el conocimiento ampliamente demostrado de que el sistema inmune tiene la capacidad de reconocer, destruir y modular la inmunogenicidad del cáncer, abrió nuevos horizontes de terapias para el control de esta enfermedad. Específicamente durante la última década, se han realizado grandes avances en el desarrollo de inmunoterapias para el tratamiento del cáncer como alternativa a las tradicionales quimio y radioterapias (Myc, 2011).

Entre los distintos abordajes inmunoterapéuticos que han sido evaluados para el tratamiento del cáncer se destacan las citoquinas, las vacunas, los anticuerpos monoclonales dirigidos a antígenos tumorales, los anticuerpos inhibidores de puntos de control inmunológico y las terapias de transferencia adoptiva de células inmunes (Yang, 2015).

La manipulación terapéutica de las citoquinas del microambiente tumoral constituye una estrategia para estimular respuestas inmunes protectoras. Las terapias

con citoquinas han sido evaluadas tanto a través de la administración sistémica como intratumoral, y se han obtenido resultados favorables en estudios pre-clínicos para varias de ellas, incluyendo IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, IFN- α , IFN- γ , TNF- α , y los factores estimulantes de colonias de granulocitos (G-CSF) y de macrófagos (M-CSF) (Dranoff, 2004). Además, las citoquinas han sido utilizadas como adyuvantes en vacunas terapéuticas contra el cáncer (Capitini, 2009).

Las vacunas contra el cáncer están diseñadas para aumentar la capacidad del sistema inmune de reconocer y destruir las células tumorales. Se han desarrollado vacunas antigénicas, vacunas basadas en DCs y vacunas de ácidos nucleicos, en formatos tanto profilácticos como terapéuticos (Mellman, 2011). En el caso de las vacunas antigénicas, la terapia consiste en la administración de elementos específicos del cáncer al paciente, junto con adyuvantes inmunológicos o en ausencia de estos, para inducir respuestas inmunes contra el tumor. Tumores de alta inmunogenicidad como melanoma, o carcinoma de células renales, han sido blancos para la investigación en vacunas antigénicas dado que presentan numerosos antígenos asociados a tumor. Sin embargo, a pesar de observarse resultados prometedores en estudios preclínicos, los beneficios alcanzados en el ámbito clínico han sido limitados (Kaufman, 2012). Posiblemente, la baja eficacia de las vacunas terapéuticas se debe a las estrategias exitosas desarrolladas por los tumores para evadir los mecanismos efectores del sistema inmune, como fue discutido anteriormente.

Varios anticuerpos monoclonales generados por ingeniería genética, tanto solos como conjugados con radioisótopos, moléculas citotóxicas o inmunotoxinas, han mejorado las tasas globales de respuesta y las tasas de remisión completa, así como la supervivencia libre de progresión en múltiples tipos de cáncer, incluyendo el

cáncer de mama, cáncer de colon y linfomas (Khan & Sadroddiny, 2015; Akbari, 2017). Entre estos anticuerpos monoclonales puede destacarse el Trastuzumab, el cual reconoce el receptor Her2 y ha demostrado tener un impacto clínico significativo en pacientes con cáncer de mama que sobreexpresan este receptor (Zardavas, 2016).

Los avances más recientes y relevantes en inmunoterapia del cáncer han tenido lugar mediante la utilización de anticuerpos monoclonales dirigidos a receptores que regulan las respuestas inmunes. A diferencia de las vacunas terapéuticas que inducen nuevos linfocitos T antitumorales después de la inmunización, estos anticuerpos antagonizan puntos de regulación del sistema inmune, mejorando la función de las linfocitos T antitumorales preexistentes (Ni & Dong, 2017). Se destacan principalmente en este tipo de inmunoterapia los anticuerpos anti-PD-1/PD-L1 y anti-CTLA-4, los cuales ya cuentan con la aprobación de la FDA (*Food and Drug Administration, USA*) para su utilización en una variedad de cánceres (Pitt, 2016; Chae, 2018).

Hasta ahora, las inmunoterapias sólo han mostrado beneficios para un porcentaje minoritario de pacientes. Ésto, en parte, se debe a que para ser efectivas las inmunoterapias deben desarrollar estrategias para aumentar la calidad y cantidad de células inmunes efectoras, revelar antígenos tumorales y/o eliminar los mecanismos inmunosupresores inducidos por las células tumorales (Schreiber, 2011). En este sentido, existe un gran interés por encontrar asociaciones terapéuticas que permitan mejorar las tasas de respuesta.

Actualmente, el campo de la oncología clínica ha entrado en una era de medicina personalizada, en donde se busca seleccionar el tratamiento más adecuado según la enfermedad del paciente, con el objetivo de aumentar la eficacia

y disminuir la toxicidad. En el marco del tratamiento personalizado del cáncer, resultan críticos los esfuerzos continuos por descubrir biomarcadores predictivos de respuesta al tratamiento, que puedan ser utilizados como herramientas diagnósticas complementarias (La Thangue & Kerr, 2011).

1.5 Relación cáncer - parásito

Las alteraciones genéticas que conducen a la carcinogénesis pueden ser inducidas tanto por factores intrínsecos como extrínsecos. Los factores intrínsecos incluyen errores en los procesos de replicación y reparación del ADN, así como susceptibilidades determinadas por herencia genética. Por otra parte, los factores extrínsecos comprenden carcinógenos químicos, radiaciones ionizantes y UV, y agentes infecciosos, entre otros (Wu, 2015).

En particular, los agentes infecciosos (incluyendo virus, bacterias y parásitos) son responsables de más del 15% de los cánceres (Plummer, 2016). Algunos de estos agentes biológicos pueden inducir la transformación maligna de forma directa, como en el caso de los virus de la familia del papilomavirus humano (HPV) tipo 16 y 18, el virus linfotrópico de células T tipo 1 (HTLV-1) y el virus herpes asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV). Otros agentes actúan como carcinógenos de forma indirecta, ya sea mediante la inducción de inmunosupresión, como el VIH-1, o generando un estado de inflamación crónica y estrés oxidativo, como se ha descrito para los virus de la hepatitis (HBV y HCV) y la bacteria *Helicobacter pylori* (Bouvard, 2009).

Entre los parásitos, este último mecanismo de carcinogénesis indirecta ha sido evidenciado para *Schistosoma haematobium*, *Opisthorchis viverrini*, y *Clonorchis sinensis* (Fried, 2011). Sin embargo, datos epidemiológicos indican que existe una correlación inversa entre la incidencia de ciertas infecciones parasitarias y el desarrollo de cáncer en humanos (Darani, 2012). Entre los distintos estudios que han

reportado de forma independiente esta correlación negativa, se encuentra una investigación epidemiológica realizada en Turquía en la que se estudió el vínculo entre la infección por el parásito *Echinococcus granulosus* (*E. granulosus*), agente causal de la hidatidosis, y el cáncer. En este estudio, se determinó que la frecuencia de hidatidosis en pacientes con cáncer era significativamente menor en comparación con la población sana (Akgül, 2003). En este mismo sentido, en pacientes con megacolon chagásico inducido por la infección con *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) no se observó un aumento de la incidencia de cáncer de colon, a pesar de que el megacolon se asocia con factores de riesgo para este tipo de cáncer, incluyendo la hiperplasia del tejido, las úlceras mucosas y la inflamación crónica. Esta observación sugiere la existencia de un efecto protector contra el cáncer de colon en pacientes infectados con *T. cruzi* (García et al, 2003). Apoyando estos estudios, los parásitos *T. cruzi*, *E. granulosus*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium yoelii*, *Toxocara canis* y *Acanthamoeba castellanii* han demostrado conferir resistencia frente al desarrollo tumoral en numerosos modelos animales (Darani, 2012).

Ha sido demostrado que la protección de los parásitos frente al cáncer está mediada, al menos en parte, por la inducción de una respuesta inmune antitumoral. Entre las numerosas evidencias experimentales que apoyan esta idea, se observó que la infección con *Plasmodium*, agente causal de la malaria, suprime el crecimiento del carcinoma pulmonar de Lewis, a través de la inducción de una respuesta inmune específica contra el tumor, caracterizada por una producción aumentada de citoquinas tipo Th1 (Chen, 2011). También ha sido demostrado que el parásito *T. gondii* genera inmunidad antitumoral con efectos terapéuticos, al revertir el microambiente inmunosupresor en cáncer de ovario, permitiendo estimular respuestas potentes de linfocitos T CD8+ (Baird, 2013).

A pesar de los avances considerables en los efectos antineoplásicos de varios parásitos, los mecanismos subyacentes a la inhibición del crecimiento tumoral aún no son bien conocidos. La presencia de antígenos comunes entre parásitos y cáncer podría explicar por qué sólo algunos parásitos muestran actividad antitumoral. Particularmente, se han observado similitudes entre parásitos y células tumorales en la expresión de estructuras de glicosilación aberrante.

La glicosilación aberrante juega un rol fundamental en la progresión tumoral y la metástasis, y es considerada actualmente como un *hallmark* del cáncer. Esto no es sorprendente, considerando que los glicanos cumplen roles en la señalización celular, la adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular, el metabolismo, la angiogénesis y la modulación del sistema inmune (Munkley, 2016). Las estructuras de glicosilación aberrante en cáncer se conocen como antígenos carbohidratos asociados a tumor (TACAs, por sus siglas en inglés) (Kieber-Emmons, 2017). Se ha evidenciado que la fucosilación y la sialilación aumentadas, así como la O-glicosilación truncada, representan firmas características de la transformación celular maligna y conducen a la expresión de TACAs (Blanas, 2018). Particularmente, los patrones de O-glicosilación en cáncer difieren de aquellos observados en las células normales, presentando cadenas glucídicas más cortas, que constituyen los denominados antígenos de O-glicosilación truncada (Hakomori, 2002; Yu, 2007). Muchos de estos patrones de O-glicosilación truncada representan marcadores tumorales de relevancia, entre los que se encuentran los antígenos Tn (GalNAc- α -Ser/Thr), sialil-Tn (ácido N-acetilneuraminico- α 6-GalNAc- α -Ser/Thr), Tk (GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-3)Gal), y TF (Gal- β (1-3)-GalNAc) (Yu, 2007; Van Kooyk, 2008).

Estos motivos de glicosilación no solamente han sido identificados en cáncer, sino que también se ha visto que se encuentran ampliamente distribuidos entre

diferentes parásitos (Osinaga, 2007). De hecho, se ha identificado la expresión de los antígenos Tn y sialil-Tn en extractos del parásito *E. granulosus* (Álvarez Errico, 2001), así como la presencia del antígeno TF en el parásito adulto y en la pared del quiste hidático (Casaravilla, 2003a; Díaz, 2009). Adicionalmente, se describió la presencia del antígeno Tn y Tk en ciertos parásitos helmintos (Casaravilla, 2003b; Ubillos, 2007) y la expresión del antígeno sialil-Tn en *T. cruzi* (Freire, 2003).

Además de estas similitudes estructurales, se han observado distintos mecanismos biológicos compartidos entre los parásitos y el cáncer. En particular, ambos se caracterizan por un fenotipo invasor, que requiere de moléculas capaces de establecer adhesiones célula-célula y célula-matriz extracelular, desarrollar proteólisis y presentar motilidad. Las moléculas que gobiernan los procesos de invasión, incluyendo integrinas, metaloproteasas de matriz y receptores de quimioatrayentes como RANTES, están presentes tanto en células tumorales como en parásitos (Lauwaet, 2000). También se han descrito semejanzas entre parásitos y tumores a nivel de la capacidad de desarrollar mecanismos de resistencia a diferentes drogas de uso terapéutico. La glicoproteína P, en particular, ha sido identificada por modular el fenotipo de multirresistencia a drogas tanto en células de diversos tumores así como en los parásitos protozoarios *Plasmodium* y *Leishmania* (Pérez-Victoria, 2002). Finalmente, muchos parásitos generan estrategias de evasión o modulación del sistema inmune, compartiendo algunos de los mecanismos mencionados anteriormente para las células tumorales. A modo de ejemplo, se ha descrito que la respuesta inmune frente a ciertas infecciones parasitarias mediadas por helmintos se caracteriza por un aumento en la expresión de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- β , promoviendo así la generación de linfocitos T reguladores (Maizels, 2004).

1.6 *Trypanosoma cruzi* y cáncer

El presente trabajo se enfoca particularmente en el parásito protozoario flagelado *T. cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Esta enfermedad es una zoonosis con alta incidencia en América latina, y afecta a un amplio rango de vertebrados salvajes y domésticos, desde donde se transmite al ser humano a través de insectos hematófagos del género *Triatoma*. A su vez, *T. cruzi* también puede ser transmitido en ausencia de dicho vector biológico, ya sea mediante transfusiones sanguíneas, el consumo de alimentos contaminados o por transmisión vertical (D'Avila, 2012).

T. cruzi es un parásito intracelular con un ciclo de vida complejo, que involucra varias etapas de desarrollo dentro de sus hospederos vertebrados e invertebrados (figura 4). Cuando el insecto pica a un hospedero mamífero infectado con *T. cruzi*, algunos tripomastigotas pasan a él a través de la sangre. Al llegar al intestino medio del invertebrado, estos se transforman en epimastigotas, los cuales se multiplican por fisión binaria y pasan al intestino distal, donde se convierten en tripomastigotas metacíclicos. El insecto evacúa los tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* a través de las heces, que son depositadas sobre el hospedero en un sitio cercano al de la picadura, facilitando la entrada de los parásitos en su forma infectiva a través de la herida o de las membranas mucosas (Buscaglia, 2006).

Al entrar en una célula mamífera, los tripomastigotas metacíclicos se convierten en amastigotas y se reproducen nuevamente por fisión binaria. Después de la multiplicación, un gran número de amastigotas se acumulan en la célula infectada, formándose pseudoquistes. Los amastigotas se convierten otra vez en tripomastigotas (distintos de la forma metacíclica), y estos se liberan al torrente sanguíneo luego de la ruptura celular. Como ruta alternativa para la propagación de

la infección, los amastigotas liberados por células infectadas pueden invadir activamente los macrófagos. El ciclo se cierra cuando un nuevo vector triatomino se

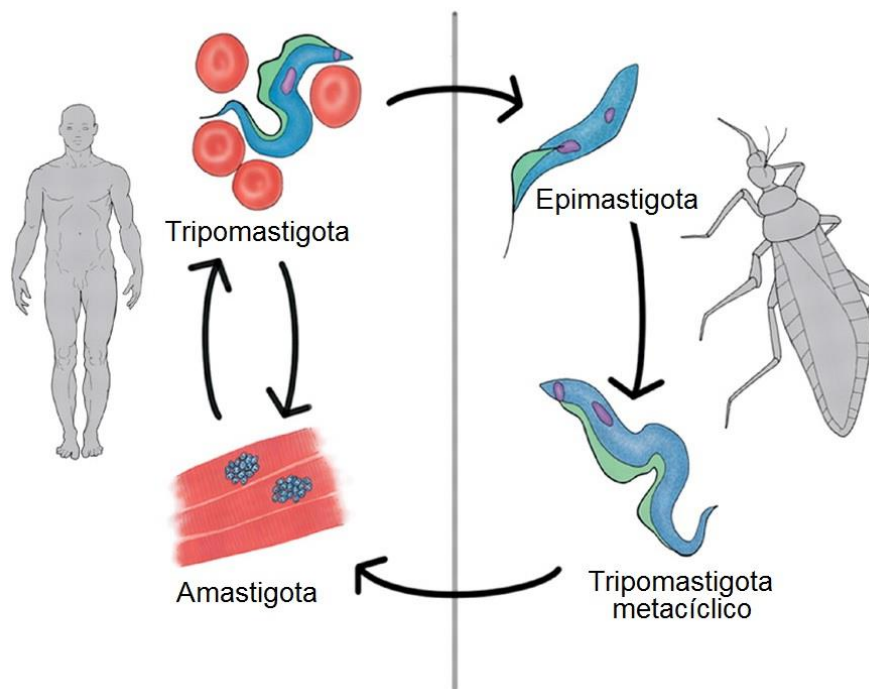


Figura 4. Ciclo de vida de *T. cruzi*. Se detallan las diferentes etapas de desarrollo en el ciclo de vida del parásito: epimastigota, tripomastigota metacíclico, amastigota y tripomastigota, según su hospedero. Modificado de Atwood, 2005.

alimenta del mamífero infectado con *T. cruzi* (Buscaglia, 2006).

Roskin y Exemplarskaia fueron los primeros en reportar que la infección con *T. cruzi* podía inhibir el crecimiento de células tumorales (Roskin & Exemplarskaia, 1931). La idea de inducir infecciones agudas para curar tumores malignos se remonta al siglo XIX con William Coley, considerado un pionero en el terreno de la inmunoterapia por su utilización de estreptococos para tratar pacientes con cánceres inoperables. Sin embargo, la influencia más directa para los trabajos de Roskin probablemente proviene de la “malarioterapia” de Julius Wagner-Jauregg, quien demostró que la estimulación del sistema inmune con el parásito protozoario *Plasmodium* no solamente permitía combatir la malaria, sino también la sífilis terciaria causante de demencia parálitica (Krementsov, 2009).

La malarioterapia posiblemente inspiró a Roskin a buscar un arma biológica contra el cáncer entre los protozoarios, seleccionando a *T. cruzi* por su peculiar ciclo de vida, que guarda semejanzas con el de *Plasmodium*. A diferencia de otros parásitos relacionados, que viven y se reproducen en el torrente sanguíneo, *T. cruzi* migra hacia varios órganos, incluyendo corazón, hígado y bazo, donde invade las células y se reproduce. Este tropismo hacia algunos órganos particulares condujo a Roskin a hipotetizar que, debido a cierta especificidad biológica, los tumores podrían resultar blancos atractivos para el parásito (Krementsov, 2009).

Los experimentos de Roskin, en los que ratones fueron implantados con el carcinoma de Ehrlich, al mismo tiempo que se infectaron con *T. cruzi*, parecieron confirmar estas ideas. En estos experimentos, todos los ratones del grupo control, es decir, no infectados con el parásito, murieron a causa de los tumores, mientras que entre los 45 ratones infectados, 30 demostraron la desaparición completa de sus carcinomas y los 15 restantes exhibieron una reducción significativa del tamaño tumoral. Así, Roskin concluyó que *T. cruzi* tenía un efecto bioterapéutico frente al desarrollo de carcinomas en ratón (Roskin & Exemplarskaia, 1931).

A su vez, Roskin pudo probar que no solamente los parásitos vivos, sino también sus extractos mostraban una actividad antitumoral, y que entre varios protozoarios sólo *T. cruzi* producía dicho efecto. Adicionalmente, se logró confirmar que la protección se perdía si el sistema inmune del animal era suprimido, resaltando la importancia del mismo en la actividad antitumoral del parásito (Roskin & Romanova, 1935; 1937; 1938a; 1938b).

Estas ideas han sido retomadas en numerosos trabajos más actuales, en los que también se demuestra el efecto antitumoral de *T. cruzi* utilizando abordajes tanto profilácticos como terapéuticos. Por ejemplo, en modelos de carcinogénesis química

en rata utilizando 1,2-dimetilhidrazina (DMH), se observó que el grupo de animales infectados con *T. cruzi* presentó una menor incidencia de cáncer de colon frente a los animales no infectados (Oliveira, 2001). Asimismo, se reportó que la cepa CH4 de *T. cruzi* no solamente presenta tropismo por el tumor, sino que además inhibe el desarrollo y las metástasis del linfoma sólido L5178Y-R cuando el mismo es trasplantado en ratones de la cepa Balb/C (Mel'nikov, 2004). Además, en animales inmunizados con lisados de *T. cruzi*, se observó que el desafío con sarcoma-180 o adenocarcinoma de Ehrlich conducía al desarrollo de tumores aproximadamente dos veces más pequeños que aquellos desarrollados por los animales no inmunizados, y que la actividad antitumoral se relacionaba directamente con los niveles de anticuerpos contra el parásito (Kallinikova, 2006). Este último hallazgo destaca la importancia de la respuesta inmune humoral en el efecto oncoprotector inducido por *T. cruzi*. A su vez, cabe mencionar que el rol de la inmunidad celular también ha sido demostrado en la actividad antitumoral de *T. cruzi* (Zenina, 2008).

Continuando con el análisis de los posibles mecanismos involucrados en el efecto protector conferido por *T. cruzi*, algunos trabajos han reportado que ciertos productos derivados del parásito poseen la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral. Por ejemplo, una proteína recombinante equivalente a la glicoproteína gp82 de *T. cruzi* ha mostrado tener actividad pro-apoptótica sobre células tumorales (Atayde et al, 2008), mientras que la proteína chaperona calreticulina (TcCRT), se ha relacionado con propiedades anti-inflamatorias y anti-angiogénicas, demostrando efectos antitumorales *in vivo* (López, 2010).

Siguiendo esta línea, nuestro grupo ha obtenido resultados que muestran que extractos de epimastigotas de la cepa Dm28c de *T. cruzi* son capaces de inducir respuestas inmunes de utilidad en el tratamiento de tumores en distintos modelos

murinos de cáncer experimental. Específicamente, nuestro grupo ha demostrado que la inmunización con un extracto total de *T. cruzi* induce una importante respuesta protectora antitumoral en dos modelos de cáncer en rata; cáncer de colon inducido por DMH y cáncer de mama inducido por N-nitroso-N-metilurea, determinando el desarrollo de un menor número de lesiones malignas en animales inmunizados frente a los no inmunizados (Ubillos, 2016).

Por otra parte, hemos observado que estos extractos de *T. cruzi* también generan respuestas antitumorales efectivas en ratones, en modelos basados en la implantación de células tumorales singénicas, incluyendo las líneas de cáncer de mama diseminado 4T1 (Tramontin, 2018), cáncer de colón CT26 y carcinoma pulmonar de Lewis (LL/2) (Monin, 2011).

A partir del modelo LL/2 se evaluaron los mecanismos efectores del sistema inmune involucrados en la respuesta antitumoral inducida por *T. cruzi*, sugiriéndose la implicación de los linfocitos T CD8+ y células NK con capacidad citotóxica (Monin, 2011). Se observó también que la inmunización con el extracto le confiere a las células del bazo una mayor capacidad citotóxica sobre las células LL/2 y desencadena una respuesta humoral que involucra anticuerpos IgM e IgG (Monin, 2011). Además, datos preliminares en este modelo muestran que la oxidación de los azúcares presentes en el extracto de origen parasitario con metaperiodato disminuye la actividad antitumoral del mismo, indicando que los antígenos carbohidratos presentan un rol importante.

En este mismo sentido, se comprobó por diversas técnicas que sueros de animales sanos inmunizados con *T. cruzi*, presentan anticuerpos que reconocen distintos tipos de células tumorales, sin reconocer los tejidos normales respectivos. Esta reacción inmune cruzada por parte de los sueros anti-*T. cruzi* no solamente fue observada en modelos murinos de cáncer de colon y mama (Ubillos, 2016), sino

también en más de 700 muestras de diversos tejidos tumorales y no tumorales humanos, reafirmando que los anticuerpos anti-*T. cruzi* reconocen preferentemente tejidos tumorales (Tramontin, 2018).

En suma, estos antecedentes destacan la potencial utilidad terapéutica de *T. cruzi* frente al cáncer, resaltando la necesidad de una comprensión más profunda sobre los mecanismos responsables del efecto antitumoral ya ampliamente demostrado para este parásito. A su vez, las evidencias de reactividad cruzada entre *T. cruzi* y cáncer abren nuevos horizontes en el terreno del diagnóstico tumoral, para lo que se requiere una caracterización detallada de los antígenos involucrados. En este trabajo se evaluó la reactividad cruzada entre *T. cruzi* y la línea celular tumoral LL/2, logrando identificar los antígenos tumorales involucrados en la misma.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

El presente trabajo tiene como objetivo general la evaluación de la reactividad cruzada entre el parásito *T. cruzi* y células tumorales LL/2, y la identificación de los antígenos involucrados en la misma.

2.2 Objetivos específicos

- A) Evaluar, mediante abordajes técnicos complementarios, el reconocimiento específico de antígenos tumorales presentes en la línea celular LL/2 por un suero anti-*T. cruzi* producido en conejo.
- B) Identificar los antígenos de reactividad cruzada entre *T. cruzi* y LL/2 por espectrometría de masas.
- C) Evaluar la presencia de motivos carbohidratos compartidos entre *T. cruzi* y células LL/2 mediante el reconocimiento por lectinas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Líneas celulares

La línea celular de origen murino LL/2 (cáncer de pulmón, cepa C57BL/6) fue adquirida de la *American Type Culture Collection* (ATCC). Las células fueron cultivadas en DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium* - Gibco, Thermo Fischer Scientific), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB – Gibco, Thermo Fischer Scientific), 1% de L-glutamina y piruvato de sodio, y antibiótico Penicilina-Estreptomicina (Life Technologies), referido aquí como medio completo, en estufa a 37°C con atmósfera de 5% de CO₂. Los pasajes celulares se realizaron lavando las células con *buffer* fosfato salino (PBS) e incubando con una solución de Tripsina EDTA 0.05% (Life Technologies) por 1 min a 37°C.

3.2 Extractos celulares

Para la generación de extractos totales de la línea celular LL/2, se utilizaron células procedentes de cultivos en fase exponencial de crecimiento. Las células fueron lavadas dos veces con PBS centrifugando a 1200 rpm por 5 min. Se utilizó un *buffer* de lisis hipotónico [Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tritón X-100 1%, pH 7.0, complementado con inhibidores de proteasas (*Protease Inhibitor Mix* – GE Healthcare Life Sciences)]. Se agregó 1 mL de *buffer* de lisis cada 5x10⁶ células, y se realizó una incubación de 20 min en hielo, con vortex cada 5 min. Luego, las muestras fueron sonicadas con 6 pulsos de 10 seg a 15% de amplitud, espaciados por 10 seg de descanso, en un sonicador Branson Ultrasonics Sonifier S-450. El extracto fue centrifugado a 14000 g por 10 min a 4°C y el sobrenadante se almacenó a -80°C hasta su uso.

Los extractos de LL/2 para electroforesis bidimensional (2D) también se generaron a partir de células procedentes de cultivos en fase exponencial. Las mismas fueron lavadas 2 veces con PBS e incubadas con *buffer* de lisis 2D (Tris base 30 mM, Tiourea 2 M, Urea 7 M, CHAPS 4%, pH 8.5) complementado con inhibidores de proteasas (*Protease Inhibitor Mix* – GE Healthcare Life Sciences), en hielo. Luego, las muestras fueron sonicadas como se describió previamente, y el extracto obtenido fue centrifugado a 14000 rpm por 20 min a 4°C. El sobrenadante se almacenó a -80°C hasta su uso.

3.3 Cultivo de *Trypanosoma cruzi*

Se cultivaron epimastigotas de la cepa Dm28c de *T. cruzi* en estufa a 20°C en medio de cultivo LIT (*Liver Infusion Tryptose*) suplementado con 10% de SFB (Gibco, Thermo Fischer Scientific), Hemina (Sigma-Aldrich) y el antibiótico Penicilina-Estreptomicina (Life Technologies). Los cultivos fueron escalados hasta alcanzar un volumen de 1.1 L y una concentración del orden de 9×10^6 parásitos/mL correspondiente a la fase exponencial tardía de crecimiento, momento en el cual se procedió a la cosecha.

3.4 Extractos de *Trypanosoma cruzi*

Para la lisis de los parásitos se utilizó el *buffer* DOC [(Desoxicolato de Sodio 1%, Glicina 0.15 M, NaCl 0.5 M, inhibidores de proteasas (GE Healthcare) y DNAsa 0.02 mg/mL, a pH 9.0)]. Los parásitos fueron lavados dos veces con PBS centrifugando a 3000 g, por 10 min. Se agregó 1 mL de *buffer* de lisis DOC cada 1×10^9 parásitos, y los mismos fueron mantenidos en rueda giratoria por 1 h a temperatura ambiente (T_{amb}), luego 30 min a 37°C y por último 30 min a 4°C. El material extraído

se centrifugó a 20000 *g* por 1 h a 4°C (centrífuga Sorvall RC 6 Plus - rotor SS-34). Finalmente, el sobrenadante fue alicuotado y almacenado a -80°C hasta su uso.

3.5 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas de los extractos de LL/2 y de *T. cruzi* fue determinada mediante el método colorimétrico del ácido bicinconínico (BCA) en placa de fondo plano de 96 pocillos. Para esto, se realizó una curva de calibración por triplicado con seroalbúmina bovina (BSA – Sigma-Aldrich) entre 0.1 y 1 mg/mL y se cuantificaron por duplicado 10 µL de diferentes diluciones de los extractos. Cada muestra fue incubada con 200 µL de una mezcla de BCA (Sigma-Aldrich) y CuSO₄ 5% en una relación 50:1, durante 30 min a 37°C. Posteriormente, se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas Multiskan EX (Thermo Fischer Scientific).

Los extractos totales de LL/2 preparados para electroforesis bidimensional no fueron cuantificados por BCA, debido a que la concentración elevada de urea en el *buffer* de lisis interfiere con el método. En cambio, la cuantificación se realizó utilizando el *2-D Quant Kit* (GE Healthcare), siguiendo el protocolo estándar recomendado.

3.6 Suero de conejo anti-*Trypanosoma cruzi*

La generación del suero de conejo anti-*T. cruzi* se llevó a cabo en la Unidad de Reactivos Biológicos y de Experimentación (URBE) de la Facultad de Medicina de la Universidad de la República. Para ello se inyectó un conejo por vía subcutánea con 1 mL de una solución conteniendo 300 µg del extracto de *T. cruzi* en 500 µL de Adyuvante Incompleto de Freund (Sigma-Aldrich) en cinco ocasiones, espaciadas

cada dos semanas. El suero fue colectado una semana después de la última inmunización y titulado por ensayos de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).

3.7 Inmunohistoquímica

Tumores extraídos de ratones 17 días después de la inoculación con células LL/2, fueron preparados en láminas por la Dra. Cecilia Silva del Laboratorio de Anatomía Patológica del Servicio Médico Integral (SMI). Para el estudio por inmunohistoquímica (IHQ), se desparafinaron las láminas mediante incubaciones sucesivas de 5 min en xilol (3 veces), isopropanol (3 veces), agua destilada (1 vez) y por último en *buffer* TBS (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM) (1 vez). Luego se bloqueó la peroxidasa endógena incubando con H₂O₂ 3% por 20 min a T_{amb} y se lavaron las láminas dos veces con *buffer* TBST (TBS Tween 20 0.05%). A continuación, se bloquearon los sitios inespecíficos incubando con suero de cabra al 30% en *buffer* de anticuerpos (Tris 50 mM, BSA 1%, pH 7.4), por 20 min a T_{amb}. Seguidamente, se incubaron las muestras por 1 h con el suero de conejo anti-*T. cruzi*, un suero de conejo pre-inmune (diluciones 1/50) o PBS. Luego de 3 lavados de 5 min con TBST, se incubaron los tejidos con un anticuerpo policlonal de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo, conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) (Dako P0448) en una dilución 1/100 por 30 min, realizando posteriormente 3 lavados adicionales. Como sustrato de la peroxidasa se utilizó el cromógeno DAB (3,3-diaminobencidina – Sigma) en una concentración de 0.5 mg/mL junto con H₂O₂ 0.3%, incubado por 20 min. Las muestras se tiñeron por 1.5 min con Hematoxilina de Mayer (Droguería Industrial), se sumergieron 10 veces en una solución de hidróxido de amonio 37 mM. Luego, se le realizaron a las muestras dos incubaciones sucesivas de 5 min en isopropanol y una en xilol, y para finalizar se montaron con bálsamo Entellan (Merck). Las imágenes

fueron tomadas utilizando un microscopio Olympus CX41 con una magnificación 200x.

3.8 Inmunofluorescencia indirecta

En una placa de 24 pocillos con cubreobjetos, se cultivaron 5×10^4 células LL/2 por pocillo con 1 mL de medio completo, por 24 h. Luego, se fijaron las células con paraformaldehído 4% (PFA - Sigma-Aldrich) durante 20 min a 4°C, y se lavaron 2 veces con PBS. Posteriormente, las células se incubaron con Tritón X-100 0.3% (Sigma-Aldrich) por 5 min a T_{amb} , para su permeabilización. Después de 3 lavados con PBS, la placa fue conservada a -20°C hasta el momento de su uso.

Para proceder con la inmunofluorescencia indirecta (IFI), se hidrataron las células por 10 min con PBS y se realizó un bloqueo por 1 h a T_{amb} con PBS BSA 5%, SFB 3%. Luego, se incubaron las células con diluciones 1/700 de los sueros anti-*T. cruzi* y pre-inmune producidos en conejo y con PBS por 40 min a T_{amb} . Se realizaron tres lavados de 5 min con PBS y se incubó con el anticuerpo policlonal de cerdo anti-inmunoglobulinas de conejo conjugado a FITC (Dako F0054) en una dilución 1/100, por 1 h a T_{amb} . Nuevamente se lavaron las células tres veces con PBS y se incubó con DAPI (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en PBS por 5 min en oscuridad, para luego realizar tres lavados adicionales. Las imágenes se obtuvieron mediante un microscopio de epifluorescencia Olympus IX81 con magnificaciones 200x y 400x, utilizando el software $\mu\text{Manager}$ v 1.4.22.

Para la cuantificación de la fluorescencia, se utilizó el software ImageJ 1.48v. Se seleccionaron 5 campos representativos por condición (suero anti-*T. cruzi* y suero pre-inmune), con un promedio de 56 ± 16 células por campo. Para todas las imágenes se determinó un mismo *threshold* global, procurando dejar por debajo del umbral mínimo cualquier señal inespecífica del *background*, y por encima del umbral máximo

artefactos de la imagen que no corresponden a un marcado celular. Se midió la intensidad de fluorescencia total a partir de los píxeles de la imagen cuyos valores de intensidad se encuentran dentro del rango establecido. En cada imagen analizada, la medida de intensidad total de fluorescencia fue normalizada por la cantidad de células presentes en el campo, obteniendo así la intensidad de fluorescencia promedio por célula. El análisis estadístico de la cuantificación de la fluorescencia se realizó a través del *software* GraphPad Prism 5, utilizando el test de Student. Se consideraron estadísticamente significativos valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) y $p < 0,0001$ (****).

3.9 Citometría de flujo

Células tumorales LL/2 provenientes de un cultivo en fase exponencial de crecimiento fueron resuspendidas en 1 mL de PFA 4% y se mantuvieron en hielo por 30 min para su fijación. Se agregaron 4 mL de PBS y se centrifugaron por 5 min a 2000 rpm. Luego, las células fueron resuspendidas en PBS - SFB 1% (condición para células no permeabilizadas) o en PBS - SFB 1% - Tween-20 0.1% (condición para células permeabilizadas) a una concentración de 1×10^6 células/mL. A continuación se sembraron 100 μ L de la suspensión celular en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo cónico, realizando triplicados para cada condición. La placa se centrifugó por 10 min a 2500 rpm, se descartó el sobrenadante y se agregaron 50 μ L por pocillo de suero de conejo anti-*T. cruzi*, suero pre-inmune de conejo (ambos en diluciones 1/200 en *buffer* apropiado según la condición) o sólo *buffer* en el caso de los controles negativos (células sin marcar y marcadas sólo con anticuerpo secundario), incubándose por 45 min a T_{amb} . Se lavaron las células tres veces con PBS centrifugando a 2000 rpm por 3 min y se prosiguió con el marcado con el anticuerpo

policlonal de cerdo anti-inmunoglobulinas de conejo conjugado a FITC (Dako F0054) en una dilución 1/50, también incubando por 45 min a T_{amb} , en oscuridad.

Luego de tres lavados adicionales con PBS, las muestras fueron analizadas en un Citómetro de flujo CyAn™ ADP (Beckman Coulter) utilizando un láser de 488 nm, y los datos obtenidos se procesaron utilizando el *software* FlowJo 7.6. Los análisis estadísticos se realizaron a través del *software* GraphPad Prism 5, utilizando el test one-way ANOVA (*one-way analysis of variance*). Se consideraron estadísticamente significativos valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***).

3.10 Western blot monodimensional

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12%, de 1.5 mm de espesor, conteniendo 10 pocillos. Se sembraron 100 μ g de proteína del extracto celular de LL2 por pocillo, en un volumen final de 24 μ L, utilizando *buffer* de muestra 6X (β -mercaptoetanol 25%, SDS 2.5%, Glicerol 50%, Buffer Tris-HCl 0.125 M, Azul de bromofenol 0.1 mg/mL, pH 6.8). Previo al sembrado del gel, las muestras se incubaron a 99°C durante 5 min para favorecer a su desnaturalización. Se utilizó un marcador de peso molecular de 10-180 kDa (*PageRuler Prestained Protein Ladder 26616*, Thermo Fisher Scientific). Las muestras se corrieron a 90 V hasta alcanzar el gel separador, para luego aumentar el voltaje a 150 V. Una vez finalizada la corrida, el gel se equilibró en buffer de transferencia (Tris base 25 mM, Glicina 192 mM, EtOH 20%) durante 15 min. 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 45 min, a 380 mA.

Para cortar la membrana en tiras de acuerdo a los carriles, la misma se tiñó con una solución de Rojo de Ponceau. Posteriormente, se procedió al bloqueo de las tiras con una solución de PBS BSA 3%, a 4°C durante toda la noche. Las membranas

se lavaron dos veces con PBS Tween 20 0.2%, y se incubaron con sueros de conejo anti-*T. cruzi* y pre-inmune, en dilución 1/1000 con PBS BSA 0.5%, Tween 20 0.1%, durante 1 h a T_{amb}. Se realizaron 3 lavados de 5 min en PBS Tween 20 0.2% y se procedió a la incubación con un anticuerpo policlonal de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo, conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) (Dako P0448) en dilución 1/3000 en PBS BSA 0.5%, Tween 20 0.1%, durante 1 h a T_{amb}. La membrana se lavó 5 veces por 5 min con PBS Tween 20 0.2%. El revelado se realizó incubando la membrana con el reactivo ECL *Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare), durante 2 min y luego exponiéndola en oscuridad junto a un film (Amersham Hyperfilm ECL GE) durante 4 min. El film fue revelado y fijado utilizando las soluciones *Carestream® Kodak® autoradiography GBX developer & fixer* (Sigma-Aldrich).

3.11 Electroforesis bidimensional y Western blot

Con el fin de eliminar sustancias interferentes, antes de proceder con la electroforesis bidimensional se utilizó el *2-D Clean-Up Kit* (GE Healthcare) para 300 ug de proteína del extracto de LL/2, según las instrucciones del protocolo A recomendado por el fabricante. Luego, previo al isoelectroenfoque, las proteínas fueron resuspendidas en 450 µL de solución de rehidratación [ditiotreitól (DTT) 18 mM, IPG *buffer* para 3-11 no lineal (GE Healthcare) 0,5%, Urea 8 M, CHAPS 0.5%, azul de bromofenol 0.002%] y se sembraron 3 *strips holders* con 125 µL cada uno. Para separar las proteínas según su punto isoeléctrico se utilizaron tiras de 7 cm con rango de pH 3-11 no lineal (*Immobiline drystrips*, GE Healthcare), que fueron colocadas en los *strip holders* por encima de las proteínas y se recubrieron con aceite mineral. El isoelectroenfoque se realizó utilizando un IPGPhor (Amersham Bioscience), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. En primer lugar, se realizó una rehidratación pasiva de las tiras por más de 12 h. Luego se realizó un

step and hold a 300 V durante 30 min, seguido de un gradiente hasta 1000 V por 30 minutos, un gradiente hasta 5000 V por 1 h y 30 min, y por último un *step and hold* a 5000 V 1500V/h.

Una vez culminado, se procedió a la separación de las proteínas según su peso molecular. Para ello, las 3 tiras se equilibraron en *buffer* de equilibración (Urea 6 M, Tris-HCl 75 mM, glicerol 2.3%, SDS 2%, azul de bromofenol 0.002%, pH 8.8), con DTT 10 mg/mL durante 15 min. Luego, las tiras se lavaron durante 15 min en *buffer* de equilibración con iodoacetamida (IAA) 25 mg/mL, utilizando 5 mL por tira. Una vez equilibradas, cada una de las 3 tiras se colocó sobre un gel de poliacrilamida de 8x10x0.1 cm al 10%. Se sembraron 5 µL del marcador de peso molecular de 10-250 kDa (*PageRuler Prestained Protein Ladder* 26619, Thermo Fischer Scientific), junto con 5 µL de agarosa fundida, sobre un papel de filtro de 0,25 cm², que también se colocó sobre el gel. Luego se agregó una solución sellante de agarosa fundida [(agarosa 0.5%, azul de bromofenol 0.002% en *buffer* de corrida (Tris base 1.5 M)] para evitar la difusión de las proteínas. Los 3 geles se corrieron en paralelo, cada uno a 10 mA durante 10 minutos y luego a 20 mA hasta que el frente de corrida alcanzó 1 cm del borde inferior del gel. Luego de la electroforesis, uno de los geles fue incubado por 30 min en solución de fijación (EtOH 50%, agua miliQ 40%, ácido acético 10%) y teñido con solución Coomassie Blue coloidal (Sigma-Aldrich) 80%, etanol 20%, durante toda la noche a T_{amb} con agitación constante. Luego el gel fue desteñido con agua destilada para visualizar las proteínas.

Los otros dos geles, se utilizaron para realizar western blots siguiendo el protocolo descrito anteriormente. En este caso la transferencia semi-seca se realizó a 300 mA por 1 h 20 min y para el bloqueo de las membranas se utilizó PBS BSA 5%. Una de las membranas se incubó con el suero de conejo anti-*T. cruzi*, mientras que

la otra se incubó con suero pre-inmune de conejo, ambos en dilución 1/500. El revelado fue realizado según las condiciones ya detalladas para el western blot monodimensional, pero en este caso el film se expuso por 25 min.

3.12 Espectrometría de masas

Los *spots* correspondientes a las proteínas de interés fueron escindidos del gel y sujetos a decoloración (para eliminar la tinción de Coomassie), mediante dos incubaciones sucesivas en buffer 50% acetonitrilo, 50% bicarbonato de amonio 0,2 M por 30 min con agitación. Luego, para deshidratar las muestras, se lavaron con acetonitrilo puro y se dejaron secar bajo la cámara de flujo. Posteriormente, se procedió a la digestión de las proteínas con tripsina apta para secuenciado (Promega V511C) a una concentración final de 0,5 ug/μl en bicarbonato de amonio 50 mM, pH 8, incubando durante toda la noche a 37°C.

Los péptidos fueron extraídos del gel mediante dos incubaciones sucesivas de 1 h en agitación con 100 uL de una solución TFA 0.1%, acetonitrilo 60%. Los sobrenadantes recuperados de las extracciones, conteniendo los péptidos tripticos, fueron concentrados en Speed-Vac y en los casos necesarios se purificaron utilizando un Zip-Tip C18 (Millipore). Se sembraron 2 μL de las muestras proteicas junto con 2 μL de solución de matriz [solución saturada de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (Sigma-Aldrich) en acetonitrilo 60%, TFA 0.1%] directamente sobre una placa de MALDI-TOF. Las muestras se dejaron secar y se analizaron en un espectrómetro de masa MALDI TOF/TOF *Analyzer* 4800, operado en el modo reflector, en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas (UByPA) del Institut Pasteur de Montevideo. El mapa peptídico obtenido para cada muestra se comparó con las bases de datos no redundantes conocidas de digestiones tripticas de proteínas de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), utilizando el motor de búsqueda MASCOT. Algunos

péptidos, identificados como picos de buena señal en el espectro, fueron fragmentados por MS/MS para determinar su secuencia parcial o total, y así facilitar la identificación de las proteínas de interés. La identificación, basada en los parámetros de búsqueda establecidos (tolerancias de masa para péptidos: ± 0.05 Da y para fragmentos: ± 0.5 Da), fue considerada como estadísticamente significativa para scores > 64 ($p < 0,05$).

3.13 Ensayo de lectinas ligado a enzimas (ELLA)

Para el ensayo de lectinas ligado a enzimas (*Enzyme-linked lectin assay* ó ELLA), se sensibilizaron placas de 96 pocillos (Corning 3590) con 100, 50, 25, 10 y 1 μg de proteína de los extractos de *T. cruzi* y LL/2, por duplicado, en *buffer* carbonato ($\text{NaHCO}_3 / \text{Na}_2\text{CO}_3$ 0.05 M, pH 9.6), dejándolas toda la noche a 4°C en cámara húmeda. El bloqueo de sitios de unión inespecíficos se realizó con una solución de PBS BSA 3%, Tween 20 0.1% por 2 h a 37°C . A continuación, se realizaron dos lavados con PBS Tween 20 0.2% y se procedió a la incubación con las lectinas biotiniladas *Sambucus Nigra* (SNA - Vector B1305) y *Ulex europaeus I* (UEA-I - Sigma-Aldrich L8262), específicas para $\alpha\text{NeuNAC}(2\rightarrow6)\text{gal}$ (y $\alpha\text{NeuNAC}(2\rightarrow3)\text{gal}$ en menor medida), y $\alpha\text{-L-fuc}$, respectivamente, diluidas en PBS BSA 0.5%, Tween 20 0.1% a una concentración de $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ durante 1 h a 37°C . Las placas se lavaron tres veces con solución de lavado y luego se incubaron con estreptavidina conjugada a peroxidasa (Sigma-Aldrich S5512) en dilución 1/1000 en PBS, por 1 h a 37°C . Se realizaron cinco lavados adicionales y se evidenció la actividad peroxidasa incubando con el sustrato ABTS [2,2-azino-bis (ácido 3-etilbenzo-tiazolino-6-sulfónico) – Sigma-Aldrich] $5 \text{ mg}/\text{mL}$ y H_2O_2 0.3% en *buffer* citrato-fosfato 0.1 M, pH 5.0 por 30 min a T_{amb} , en oscuridad. La absorbancia a 405 nm se leyó en un lector de placas Multiskan EX (Thermo Fischer Scientific).

3.14 Lectin blot

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida siguiendo las mismas condiciones descritas anteriormente para la electroforesis monodimensional, pero en este caso sembrando 50 µg de los extractos celulares de LL/2 y de *T. cruzi* en pocillos alternados. La transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa y el bloqueo de las mismas, también se realizaron según los parámetros ya mencionados para el western blot monodimensional. Las membranas (correspondientes tanto a LL/2 como a *T. cruzi*) se lavaron dos veces con PBS Tween 20 0.2%, y se incubaron con las lectinas biotiniladas SNA o UEA-I diluidas en PBS BSA 0.5%, Tween 20 0.1% a una concentración de 1 µg/mL, durante 1 h a T_{amb}. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 min, con PBS Tween 20 0.2%. Seguidamente, las membranas se incubaron con estreptavidina conjugada a peroxidasa (Sigma-Aldrich S5512) en diluciones 1/3000 y 1/5000 para *T. cruzi* y LL/2 respectivamente, en PBS BSA 0.5%, Tween 20 0.1% durante 1 h a T_{amb}. Cada membrana se lavó 5 veces por 5 minutos con PBS Tween 20 0.2%. El revelado fue realizado según las condiciones ya detalladas para el western blot monodimensional, pero en este caso el film se expuso por 4 min para las membranas incubadas con SNA y por 25 min para las membranas incubadas con UEA-I.

4. RESULTADOS

4.1 Evaluación del reconocimiento específico de antígenos tumorales presentes en la línea celular LL/2 por un suero anti-*Trypanosoma cruzi* producido en conejo, mediante abordajes técnicos complementarios:

4.1.1 Inmunohistoquímica

A los efectos de evaluar el reconocimiento de antígenos tumorales por parte del suero de conejo anti-*T. cruzi*, en un contexto tisular, se realizaron ensayos de IHQ sobre cortes de tumores LL/2. Para ello, se generaron láminas a partir de tumores LL/2 extraídos de ratones, tal como se detalla en la sección materiales y métodos. Cortes consecutivos de tejido tumoral fueron tratados con el suero de conejo anti-*T. cruzi* y un suero pre-inmune, ambos en una dilución 1/50 (figura 5).

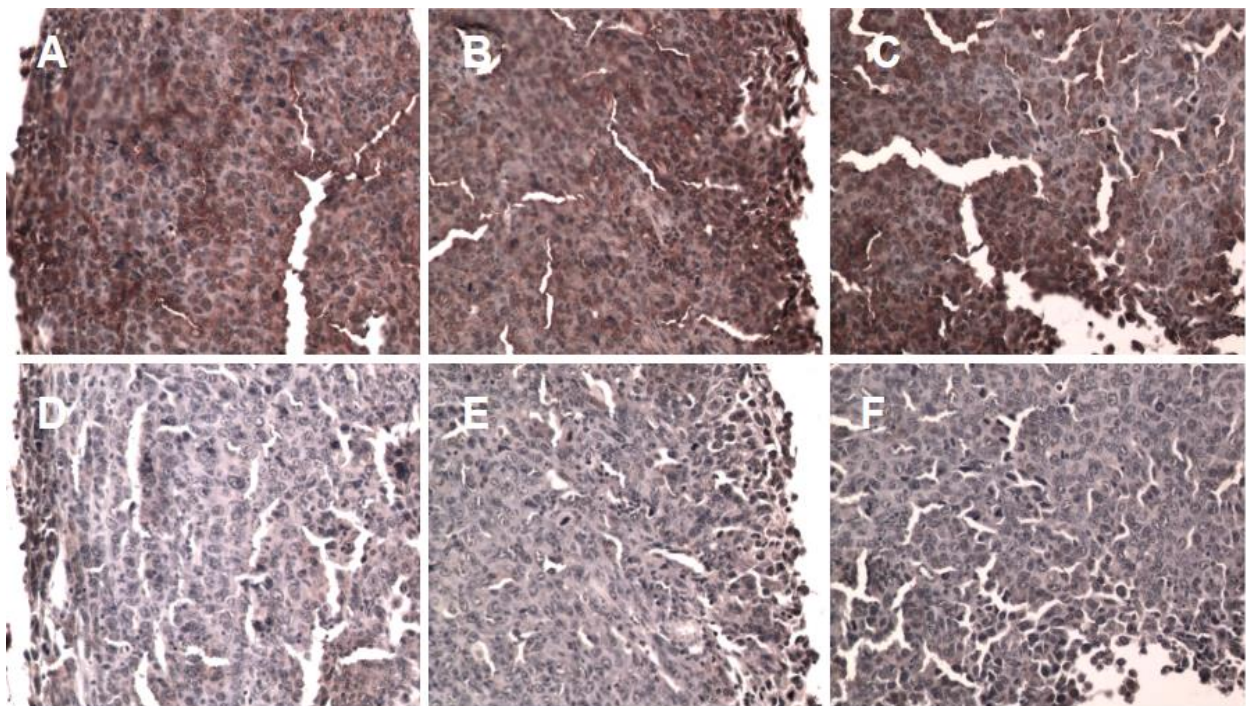


Figura 5. Evaluación del reconocimiento de antígenos tumorales de LL/2 por un suero anti-*T. cruzi* mediante IHQ. Se muestra el reconocimiento antigénico sobre cortes de tumores LL/2 por parte de un suero de conejo anti-*T. cruzi* (A-C). A modo de control, se muestran los respectivos cortes consecutivos incubados con un suero de conejo pre-inmune (D-F). Magnificación 200x. Las células fueron teñidas con hematoxilina, y el revelado fue realizado con el sustrato cromógeno DAB.

Los ensayos de IHQ fueron realizados sobre los tumores de tres animales diferentes, en los que se vio cómo el suero anti-*T. cruzi* reconoce antígenos tumorales logrando un marcado intenso de las células LL/2. En las figuras 5A-C se muestran imágenes correspondientes al tumor de uno de estos tres animales, donde puede observarse un marcado heterogéneo, con un patrón citoplasmático difuso y un componente nuclear en muchas de las células. Por el contrario, el suero pre-inmune no parece marcar el tejido tumoral de manera apreciable (figuras 5D-F).

4.1.2 Inmunofluorescencia Indirecta

Con el objetivo de evaluar la capacidad del suero anti-*T. cruzi* de reconocer estructuras antigénicas en células LL/2 aisladas, se llevaron a cabo ensayos de IFI. Las células fueron incubadas con el suero de conejo anti-*T. cruzi* en una dilución 1/700 (figuras 6A y 6B) y luego con un anticuerpo secundario conjugado a FITC. Como controles se utilizaron un suero de conejo pre-inmune, también en una dilución 1/700 (figuras 6C y 6D), y PBS. En la figura 6 se muestran resultados representativos de 3 experimentos independientes. Según lo observado en la figura 6, el suero anti-*T. cruzi* reconoce las células LL/2, mostrando un marcado intenso por el anticuerpo secundario conjugado a FITC. Por su parte, el suero pre-inmune marca algunas de las células LL/2, aunque aparentemente con menor intensidad que el suero anti-*T. cruzi*. En el control con PBS no se observó señal de fluorescencia por FITC, por lo que se descarta la posibilidad de un reconocimiento inespecífico por el anticuerpo secundario.

A los efectos de determinar diferencias en la intensidad de marcado por ambos sueros, se cuantificó la intensidad de fluorescencia promedio por célula para 5 campos representativos de cada condición, según se detalla en la sección materiales y métodos. Los resultados de esta cuantificación se pueden observar en la figura 6E,

donde se evidencia que el suero anti-*T. cruzi* reconoce las células LL/2 de forma significativamente mayor ($p < 0.0001$) que el suero pre-inmune.

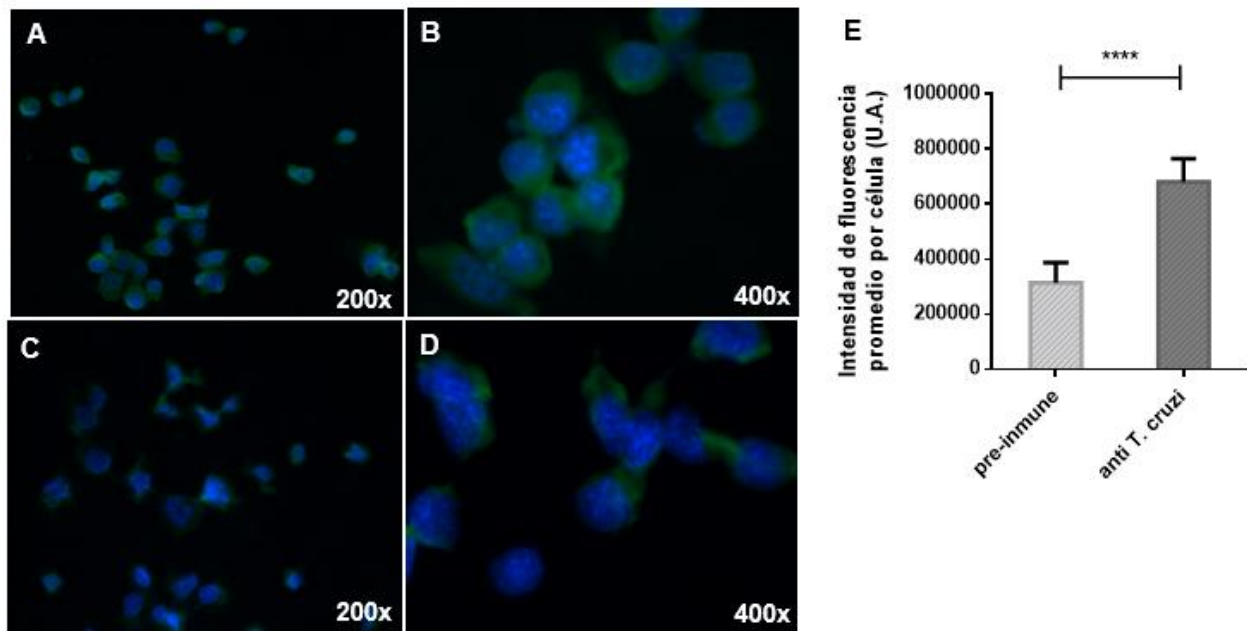


Figura 6. Evaluación del reconocimiento de antígenos tumorales de LL/2 por un suero anti-*T. cruzi* mediante IFI. Se muestra el reconocimiento antigénico sobre células LL/2 por parte de un suero de conejo anti-*T. cruzi* (A, B) y del correspondiente suero de conejo pre-inmune como control (C, D). Se presenta la cuantificación de la intensidad de fluorescencia promedio por célula (E), obtenida a partir de imágenes de IFI. $p < 0.0001$ (****).

4.1.3 Citometría de Flujo

Con el fin de cuantificar de forma más precisa el reconocimiento de estructuras antigénicas sobre las células tumorales LL/2 por el suero de conejo anti-*T. cruzi*, se realizó un ensayo de citometría de flujo. Las células fueron permeabilizadas con Tritón X-100 0,1% e incubadas con una dilución 1/200 del suero anti-*T. cruzi*, y luego con un anticuerpo secundario conjugado a FITC, logrando un marcado tanto intra-, como extracelular. A la vez, se utilizaron como controles suero pre-inmune y PBS. Como se puede apreciar en la figura 7, considerando la media geométrica de intensidad de fluorescencia, el marcado inespecífico del anticuerpo secundario fue prácticamente nulo. El suero de conejo pre-inmune marcó las células LL/2, evidenciando cierto

reconocimiento por este suero. Sin embargo, el suero anti-*T. cruzi* muestra un aumento en el reconocimiento de las células LL/2 respecto al suero pre-inmune, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$). El experimento fue repetido en tres ocasiones obteniéndose resultados similares.

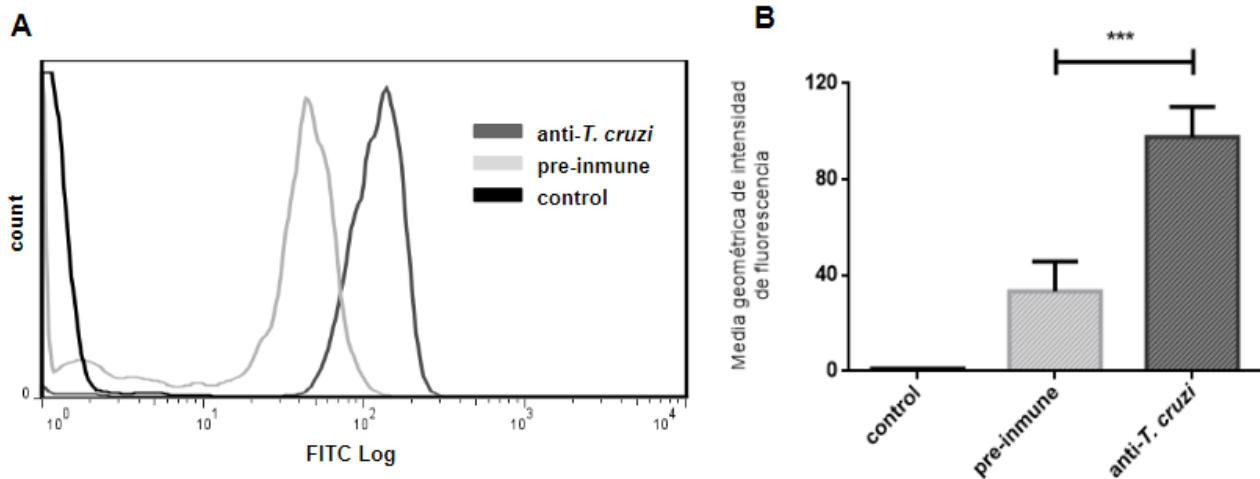


Figura 7. Evaluación del reconocimiento de antígenos tumorales intra- y extracelulares de LL/2 por un suero anti-*T. cruzi* mediante citometría de flujo. Se muestra el reconocimiento antigénico sobre células LL/2 permeabilizadas, por parte de un suero de conejo anti-*T. cruzi*, un suero de conejo pre-inmune y un control sin anticuerpo primario (A). Se presenta la cuantificación de la media geométrica de intensidad de fluorescencia (B). Se muestra la estadística intra-experimento $p < 0.001$ (***)

A su vez, con el objetivo de analizar únicamente el reconocimiento de antígenos extracelulares, se repitió el mismo experimento pero sin la permeabilización de las células LL/2. En este caso, el marcado con el suero anti-*T. cruzi* disminuyó considerablemente, aunque mantuvo la diferencia estadísticamente significativa con respecto al suero pre-inmune (figura 8) que había sido observada para la condición anterior.

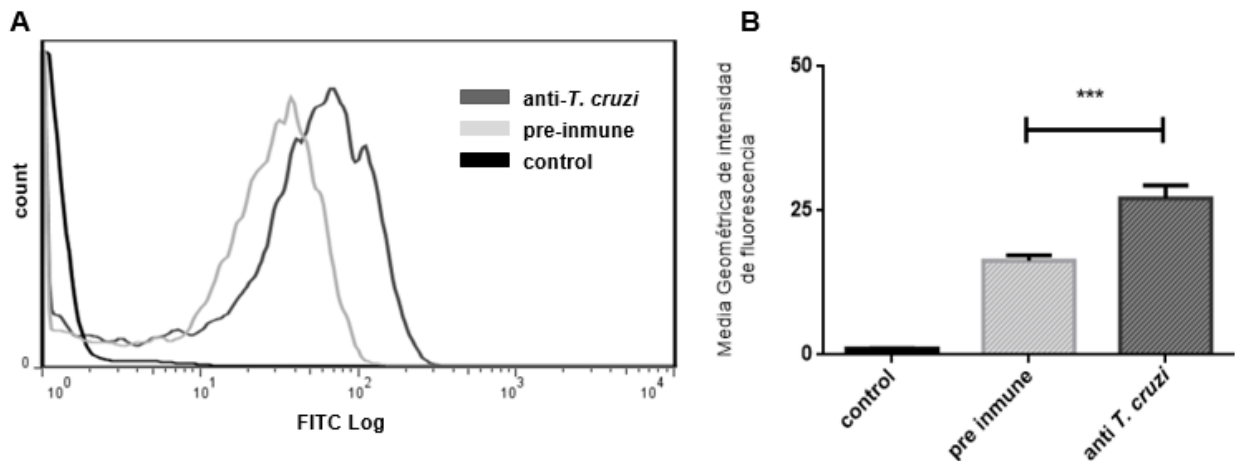


Figura 8. Evaluación del reconocimiento de antígenos tumorales extracelulares de LL/2 por un suero anti-*T. cruzi* mediante citometría de flujo. Se muestra el reconocimiento antigénico sobre células LL/2 sin permeabilizar, por parte de un suero de conejo anti-*T. cruzi*, un suero de conejo pre-inmune y un control sin anticuerpo primario (A). Se presenta la cuantificación de la media geométrica de intensidad de fluorescencia (B). Se muestra la estadística intra-experimento $p < 0.001$ (***).

4.1.4 Western Blot monodimensional

Con la intención de caracterizar el reconocimiento de las proteínas tumorales por el suero de conejo anti-*T. cruzi*, se llevaron adelante ensayos de western blot, según el protocolo detallado en materiales y métodos. Las proteínas de los extractos de las células tumorales LL/2, fueron separadas mediante electroforesis monodimensional y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para enfrentarlas contra el suero anti-*T. cruzi* y un suero pre-inmune. De esta forma, se pudo analizar el patrón de proteínas tumorales reconocidas por anticuerpos anti-*T. cruzi* (figura 9). A su vez, en la figura 9 también se puede apreciar un patrón de reconocimiento diferencial de las proteínas de LL/2 por el suero anti-*T. cruzi* respecto al suero pre-inmune. Se destacan especialmente algunas bandas, indicadas con

flechas, que son reconocidas por el suero anti-*T. cruzi*, pero que no aparecen, o aparecen con menor intensidad para el caso del suero pre-inmune.

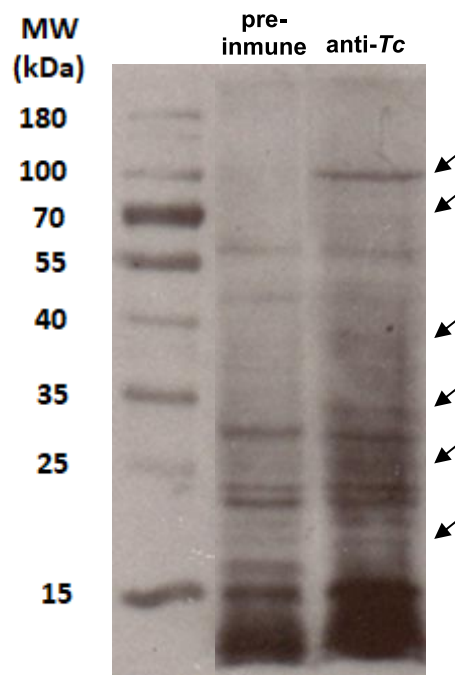


Figura 9. Evaluación del reconocimiento de antígenos tumorales en extractos proteicos de LL/2 por un suero anti-*T. cruzi* mediante western blot. Se muestra el reconocimiento antigénico por parte de un suero de conejo anti-*T. cruzi* (anti-Tc) y un suero de conejo pre-inmune sobre un extracto proteico de la línea celular LL/2. Se indican con flechas las bandas reconocidas diferencialmente por ambos sueros.

4.2 Identificación de los antígenos de reactividad cruzada por espectrometría de masas

4.2.1 Electroforesis bidimensional y western blot

A los efectos de identificar las proteínas tumorales sujetas a reactividad cruzada con *T. cruzi*, el extracto proteico de las células LL/2 fue separado mediante electroforesis bidimensional. Se realizaron tres geles en simultáneo, de los cuales uno fue teñido con Coomassie Blue coloidal, mientras que los otros dos fueron empleados para realizar western blots con los sueros de conejo anti-*T. cruzi* y pre-inmune según lo indicado en materiales y métodos. El experimento fue repetido en tres ocasiones y

en la figura 10 se muestra una réplica representativa dónde se puede observar el gel y los western blot correspondientes.

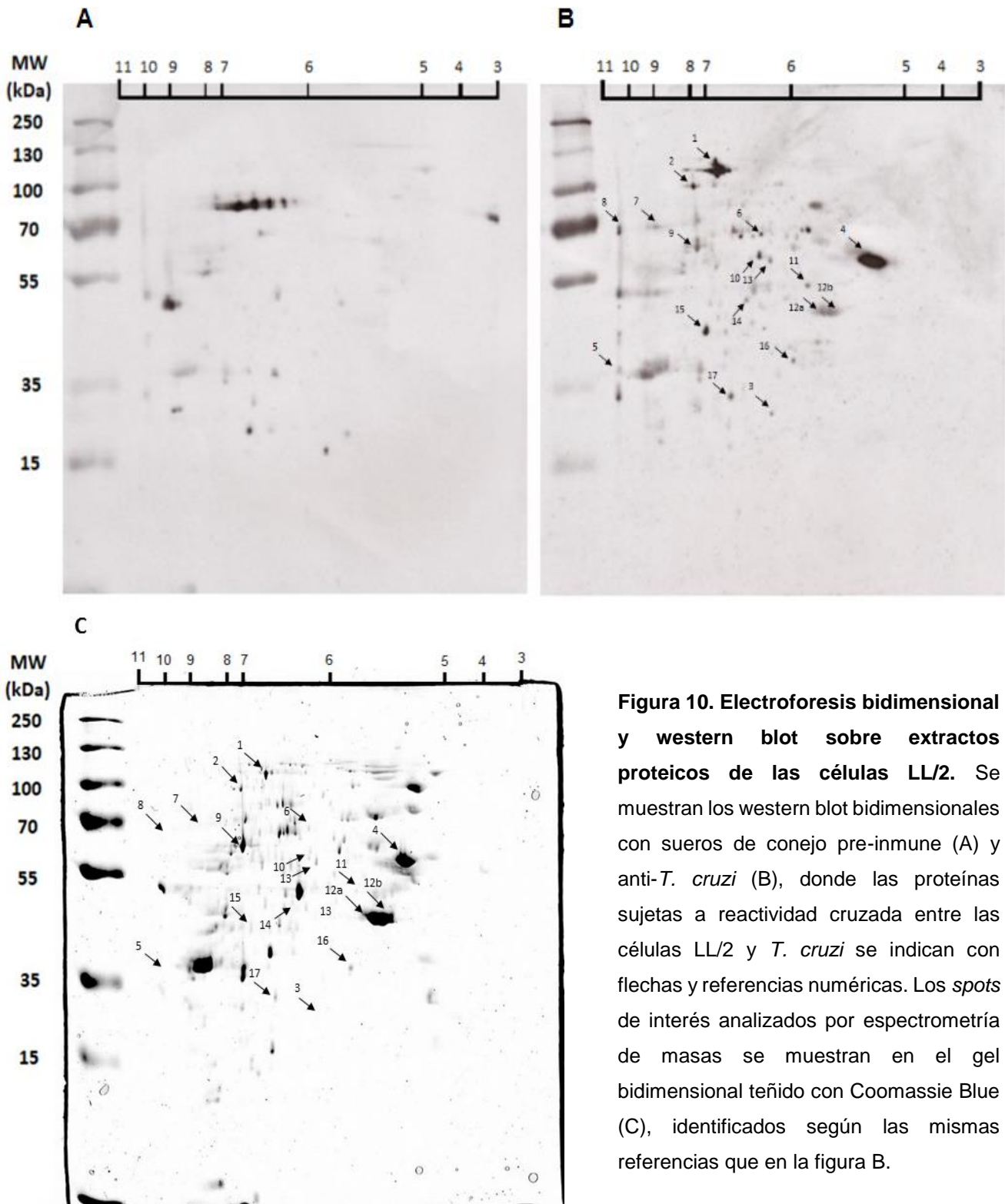


Figura 10. Electroforesis bidimensional y western blot sobre extractos proteicos de las células LL/2. Se muestran los western blot bidimensionales con sueros de conejo pre-inmune (A) y anti-*T. cruzi* (B), donde las proteínas sujetas a reactividad cruzada entre las células LL/2 y *T. cruzi* se indican con flechas y referencias numéricas. Los spots de interés analizados por espectrometría de masas se muestran en el gel bidimensional teñido con Coomassie Blue (C), identificados según las mismas referencias que en la figura B.

Los *spots* de interés, es decir aquellos que aparecen en el western blot marcado con el suero de conejo anti-*T. cruzi* (figura 10B) pero no así en el western blot correspondiente al suero pre-inmune (figura 10A), fueron localizados en el gel bidimensional de LL/2 por superposición, y se encuentran identificados con flechas en la figura 10C. Dichos *spots* fueron escindidos del gel para su digestión con tripsina y su posterior análisis por espectrometría de masas.

4.2.2 Espectrometría de masas

La identidad de los *spots* de interés fue determinada por espectrometría de masas (EM) MALDI-TOF/TOF, como se detalla en la sección materiales y métodos. A través del motor de búsqueda MASCOT y utilizando la base de datos de proteínas del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), pudieron identificarse de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$) 15 de los 18 *spots* analizados. Las proteínas identificadas se detallan en la tabla 1.

Tabla 1. Proteínas de LL/2 que presentan reactividad cruzada con *T. cruzi*, identificadas por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF.

Spot	Proteína identificada por EM	Masa mol. teórica (kDa)	Masa mol. en el gel (kDa)
1	<i>Elongation factor 2 - Mus musculus</i>	95	110
2	<i>Aconitate hydratase, mitochondrial precursor - Mus musculus</i>	85.2	100
3	<i>Proteasome subunit, alpha type 1, isoform CRA_d - Mus musculus</i>	14.1	30
4	<i>Vimentin - Mus musculus</i>	53.7	58
5	No identificada	-	38
6	<i>Dihydropyrimidinase-related protein 2 - Mus musculus</i>	62.2	65

7	No identificada	-	70
8	No identificada	-	70
9	<i>Pyruvate kinase PKM isoform X2 - Mus Musculus</i>	64.9	65
10	<i>D-3-phosphoglycerate dehydrogenase - Mus musculus</i>	56.6	60
11	<i>Actin related protein 3 - Mus musculus</i>	47.4	53
12a	<i>Actin - Mus Musculus</i>	41.7	48
12b	<i>Actin - Mus Musculus</i>	41.7	48
13	<i>T-complex protein 1 subunit beta - Mus musculus</i>	57.4	58
14	<i>Elongation factor Tu, mitochondrial isoform 1 - Mus musculus</i>	43.3	49
15	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D isoform 1 - Mus musculus</i>	40.7	45
16	<i>60S acidic ribosomal protein P0 - Mus musculus</i>	34.2	40
17	<i>S-formylglutathione hydrolase isoform 2 - Mus musculus</i>	31.3	32

Según se detalla en la tabla 1, en forma general la masa molecular teórica de las proteínas identificadas coincide con la masa observada en el gel de electroforesis (figura 10C), que fue determinada tomando como referencia el marcador de peso molecular. Las pequeñas variaciones pueden atribuirse a posibles modificaciones post-traduccionales sobre las proteínas, que no se encuentran contempladas en la masa teórica.

4.3 Evaluación de la presencia de motivos carbohidratos compartidos entre *Trypanosoma cruzi* y células LL/2 mediante el reconocimiento por lectinas

La sialilación y la fucosilación son dos procesos que se ven alterados en el marco de la glicosilación aberrante en cáncer (Blanas, 2018). Considerando esto, se analizó la presencia de fucosa y ácido siálico en el extracto de células LL/2, así como también en el extracto de *T. cruzi* para averiguar si estos motivos carbohidratos son compartidos por el parásito. La presencia de ácido siálico fue comprobada mediante el reconocimiento por la lectina SNA, específica para ácido siálico unido a galactosa terminal, preferentemente mediante enlace α -2,6 [α NeuNAC(2 \rightarrow 6)gal], y en menor medida mediante enlace α -2,3 [α NeuNAC(2 \rightarrow 3)gal]. Por su parte, la presencia de fucosa fue evaluada utilizando la lectina UEA-I, con especificidad para α -L-fucosa (α -L-fuc).

4.3.1 Ensayo de lectinas ligado a enzimas

En primer lugar, el reconocimiento de los extractos de LL/2 y *T. cruzi* por las lectinas SNA y UEA-I fue evaluado mediante ELLA, de acuerdo con lo detallado en la sección materiales y métodos. Según se observa en la figura 11, las lectinas SNA y UEA-I, ambas a una concentración de 5 μ g/mL, reconocen tanto al extracto de LL/2 como al de *T. cruzi* de forma dependiente de la cantidad de extracto. De esta manera, se evidencia la presencia de motivos α NeuNAC(2 \rightarrow 6/3)gal y α -L-fuc compartidos por glicoconjugados de LL/2 y de *T. cruzi*.

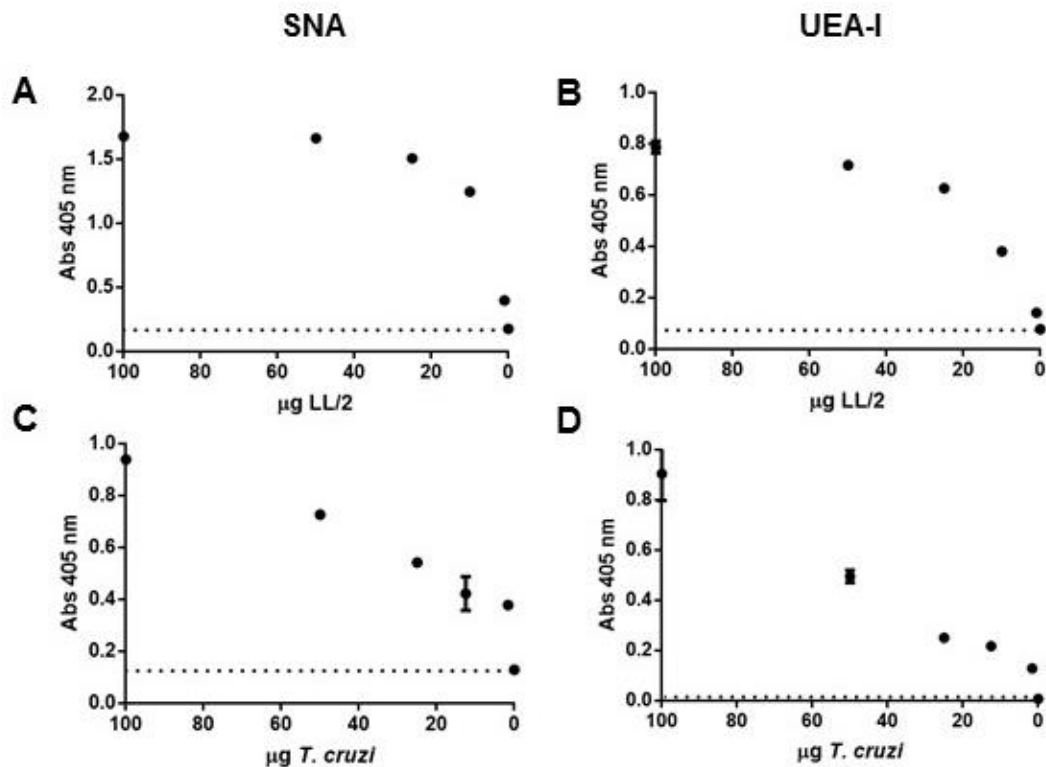


Figura 11. Evaluación de la presencia de ácido siálico [α NeuNAC(2→6/3)gal] y fucosa (α -L-fuc) en extractos de LL/2 y *T. cruzi* por ELLA. Se muestra el reconocimiento de los extractos de LL/2 (A, B) y *T. cruzi* (C, D), por las lectinas SNA (A, C) y UEA-I (B, D), ambas a una concentración de 5 μ g/mL.

4.3.2 Lectin blot

A los efectos de verificar la presencia de los motivos carbohidratos mencionados, tanto en células LL/2 como en *T. cruzi*, y caracterizar el patrón de reconocimiento de los glicoconjugados por las lectinas, se procedió a realizar ensayos de lectin blot, como se describe en materiales y métodos. Los extractos de las células tumorales LL/2 y de *T. cruzi* se separaron mediante electroforesis y luego se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para enfrentarlos contra las lectinas SNA y UEA-I a una concentración de 1 μ g/mL. Los lectin blot presentados en la figura 12 permiten evidenciar que los motivos de ácido siálico [α NeuNAC(2→6/3)gal] y fucosa (α -L-fuc) se encuentran ampliamente distribuidos entre los glicoconjugados de LL/2 y *T. cruzi*.

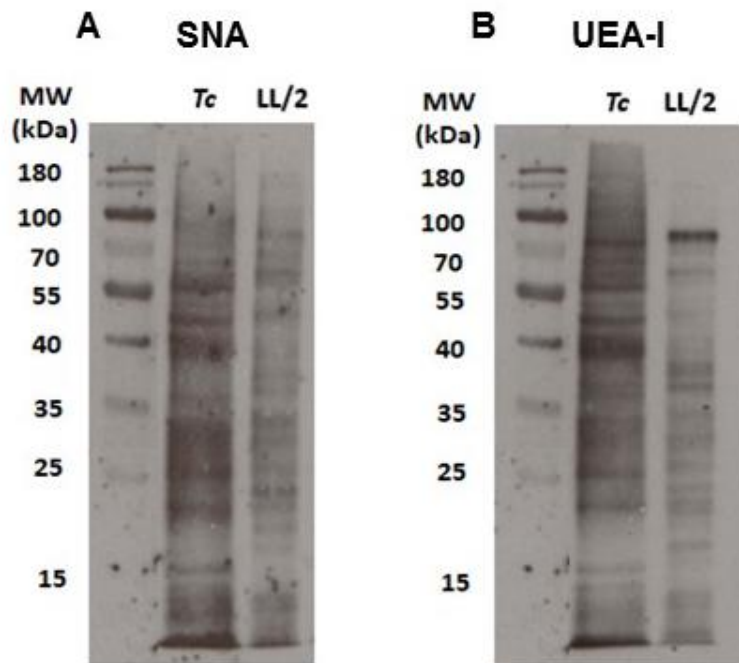


Figura 12. Evaluación de la presencia de ácido siálico [α NeuNAC(2→6/3)gal] y fucosa (α -L-fuc) en glicoconjugados extractos de LL/2 y *T. cruzi* mediante lectin blot. Se muestra el reconocimiento de los extractos proteicos de LL/2 y *T. cruzi* (*Tc*), por las lectinas SNA (A) y UEA-I (B), ambas a una concentración de 1 μ g/mL.

5. DISCUSIÓN

5.1 Evaluación del reconocimiento específico de antígenos tumorales presentes en la línea celular LL/2 por un suero anti-*Trypanosoma cruzi* producido en conejo, mediante abordajes técnicos complementarios

Mediante los distintos abordajes técnicos utilizados, incluyendo IHQ, IFI, citometría de flujo y western blot, se pudo comprobar que un suero de conejo anti-*T. cruzi* es capaz de reconocer antígenos en las células LL/2 de forma diferencial al suero de conejo pre-inmune, demostrando la existencia de reactividad cruzada entre el parásito y la línea celular tumoral.

Al evaluar el reconocimiento antigénico a partir del marcado observado en los ensayos de IHQ (figuras 5A-C), podemos observar que distintas subpoblaciones celulares del mismo tumor exhiben distintos niveles de tinción con el suero de conejo anti-*T. cruzi*., indicando heterogeneidad intratumoral, la cual es una característica propia de los tumores. Analizando, Las subpoblaciones celulares que constituyen un determinado tumor primario pueden diferir en sus características genotípicas y fenotípicas. Esta diversidad se atribuye a factores genéticos y epigenéticos, así como a mecanismos relacionados con la modulación por el sistema inmune o a diferencias a nivel de vías de señalización (Marusyk et al, 2012). La heterogeneidad intratumoral explica, en parte, por qué determinados tratamientos logran eliminar solamente algunas subpoblaciones de células tumorales, dejando un remanente de células resistentes, capaces de volver a proliferar y generar las recurrencias observadas en la clínica (Bedard, 2013).

Cuando se evaluó el reconocimiento sobre cortes de tumores LL/2 por un suero pre-inmune mediante IHQ, no se observó un marcado positivo que indique un reconocimiento antigénico por parte de los anticuerpos presentes en dicho suero (figuras 5D-F). Sin embargo, mediante las técnicas de IFI (figura 6), citometría de flujo

(figura 7), y western blot monodimensional (figura 8), sí se puede evidenciar cierto reconocimiento por el suero pre-inmune. Esta discrepancia es entendible en tanto la sensibilidad de estas últimas técnicas es mayor que la de la IHQ, especialmente en el caso de la citometría de flujo y aún más para el western blot. El reconocimiento por el suero de conejo pre-inmune podría tratarse de una unión inespecífica, aunque no puede descartarse la presencia de anticuerpos naturales en este suero que reconozcan antígenos presentes en las células tumorales LL/2 (Baumgarth, 2005; Díaz-Zaragoza, 2015). De todas formas, se comprobó mediante las técnicas de IFI y citometría de flujo que el reconocimiento de las células LL/2 por el suero anti-*T. cruzi* es significativamente mayor que en el caso del suero pre-inmune (figuras 6 y 7). Además, a través del western blot monodimensional (figura 9) se pudo evidenciar que el patrón de reconocimiento por ambos sueros es diferencial, detectándose algunas bandas para el suero anti-*T. cruzi* que no aparecen, o aparecen con menor intensidad, para el suero pre-inmune. Este patrón diferencial de reconocimiento se observó en forma mucho más clara a través del western blot bidimensional (figuras 10A y 10B).

En conjunto, estos resultados demuestran la existencia de antígenos de reactividad cruzada entre LL/2 y *T. cruzi*, en concordancia con resultados previos reportados para este parásito en otros modelos tumorales animales (Ubillos, 2016) y muestras tumorales humanas (Tramontin, 2018).

5.2 Identificación de los antígenos de reactividad cruzada por espectrometría de masas

La identificación de los antígenos de LL/2 que presentan reactividad cruzada con antígenos de *T. cruzi* es de gran interés, ya que éstos podrían servir como blancos para el diagnóstico y/o la terapia contra el cáncer. El análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF de los *spots* reconocidos diferencialmente por el suero de conejo anti-*T. cruzi* permitió identificar 14 proteínas de LL/2 que están sujetas a reactividad cruzada con antígenos de *T. cruzi* (tabla 1). En su gran mayoría se trata de proteínas intracelulares, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por citometría de flujo, en donde se observó que el reconocimiento de antígenos exclusivamente extracelulares por el suero anti-*T. cruzi* (figura 8) era minoritario en comparación con el reconocimiento de antígenos totales, es decir intra- y extracelulares (figura 7). Cabe mencionar que las condiciones experimentales desnaturalizantes sólo permiten identificar epítopes lineales compartidos, a diferencia de las técnicas de IHQ, IFI y citometría de flujo en las que se conservan las estructuras antigénicas nativas.

En cuanto a sus funciones, las proteínas identificadas están asociadas con el metabolismo energético, los procesos de síntesis y degradación proteica, el citoesqueleto y la señalización celular. De manera interesante, la gran mayoría de estas proteínas han sido vinculadas con la transformación celular maligna, como se discutirá a continuación.

Las proteínas identificadas por espectrometría de masas que están relacionadas con el metabolismo de la célula tumoral incluyen a la piruvato quinasa M2, la D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa y la aconitato hidratasa mitocondrial. Como se mencionó anteriormente, la reprogramación del metabolismo celular constituye uno de los *hallmarks* del cáncer. Las células tumorales generalmente exhiben alteraciones

metabólicas para poder alcanzar los exigentes requerimientos energéticos asociados con la proliferación aumentada y otras facetas de la transformación maligna (Hannahan & Weinberg, 2011). Las características clave de la transformación metabólica incluyen el cambio hacia la glicólisis aeróbica (conocido como efecto Warburg), la reprogramación del metabolismo mitocondrial, y la desregulación del metabolismo lipídico (Sciacovelli, 2014). Entre otros mecanismos, las alteraciones metabólicas tumorigénicas pueden ocurrir a través de la expresión de isoformas específicas de ciertas enzimas. Éste es el caso de la enzima glicolítica piruvato quinasa, que convierte al fosfoenolpiruvato (PEP) en piruvato en una reacción generadora de ATP (Ward, 2012). Los tumores expresan preferentemente la isoforma M2 de la piruvato quinasa (PKM2 por sus siglas en inglés) la cual, en contraste con la isoforma M1 (PKM1), puede adoptar una estructura dimérica caracterizada por una baja afinidad hacia el sustrato PEP. La baja actividad enzimática de PKM2 en su forma dimérica permite la acumulación de los intermediarios metabólicos de la vía glicolítica y su canalización hacia procesos de síntesis de aminoácidos, fosfolípidos y ácidos nucleicos, que son moléculas de alta demanda durante la proliferación celular (Mazurek, 2011). El reconocimiento de la proteína PKM2 por un suero anti-*T. cruzi*, evidenciado en el presente trabajo, ya había sido observado en trabajos previos de nuestro grupo en el modelo de cáncer de mama NMU (Tramontin, datos no publicados). Además, se han reportado niveles aumentados de la PKM2 tumoral en plasma de pacientes con cáncer renal, gastrointestinal, cervical, melanoma, mama y páncreas, de forma correlativa con el estadio tumoral (Kim, 2003; Kaura, 2004; Ventrucci, 2004; Lüftner, 2000; Oremek, 1999; Schneider, 2003, Ugurel, 2005; Zhang, 2004, Wechsel, 1999). Particularmente, se ha sugerido a PKM2 como un posible biomarcador para la detección tumoral en cáncer de pulmón, basado en los niveles

elevados de esta enzima en plasma de pacientes con esta enfermedad, en comparación con pacientes que padecían otros tipos de enfermedades pulmonares (Schneider, 2000).

Por su parte, la enzima D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (PHGDH), que también presenta reactividad cruzada con *T. cruzi*, cataliza la conversión del 3-fosfoglicerato a 3-fosfohidroxipiruvato desviando el flujo de la vía glicolítica hacia la síntesis de serina y glicina, precursores para una gran variedad de vías biosintéticas. Además, durante la biosíntesis de la serina se produce α -cetoglutarato, contribuyendo con la anaplerosis del ciclo de Krebs que representa en sí mismo una fuente de precursores para vías anabólicas esenciales durante la proliferación celular aumentada asociada al cáncer (DeBerardinis, 2012). Se ha visto que el gen de la PHGDH se encuentra amplificado en varios tipos de tumores, incluyendo mama y melanoma. Incluso, algunos tipos de cáncer donde no hay amplificación génica de PHGDH, muestran una sobreexpresión del ARN mensajero (ARNm) y de la proteína (Cantor, 2012). La PHGDH también ha sido identificada como marcador pronóstico en cáncer de páncreas humano y se ha demostrado su contribución a los procesos de proliferación celular, migración e invasión (Song, 2018). En el caso del cáncer de pulmón, se ha visto que la expresión de PHGDH se encuentra elevada en adenocarcinomas y cánceres de células pequeñas en humanos, en comparación con tejidos pulmonares sanos, despertando el interés en esta molécula como blanco terapéutico o de diagnóstico (Li, 2014). Siguiendo con las proteínas relacionadas al metabolismo energético, se identificó a la enzima aconitato hidratasa mitocondrial (también conocida como aconitasa), que cataliza la isomerización del citrato a isocitrato en el ciclo de Krebs (Gaude, 2014). La reactividad cruzada entre la aconitasa y *T. cruzi* ya había sido evidenciada por nuestro grupo en el modelo de cáncer de

mama NMU (Tramontin, datos no publicados). Hasta el momento, los únicos trabajos que vinculan a la aconitasa con el cáncer proponen que la disminución en la expresión de esta enzima se asocia con un peor pronóstico para cánceres gástricos y de próstata (Juang, 2004; Tsui, 2011; Wang, 2013).

Otras de las proteínas identificadas por su reactividad cruzada con *T. cruzi* se vinculan con procesos de síntesis o degradación proteica. Este es el caso del factor de elongación eucariótico 2 (eEF2), el factor de elongación mitocondrial Tu (EF-Tu), la proteína ácida P0 de la subunidad ribosomal 60S (RPLP0) y la subunidad α tipo 1 del proteasoma (PSMA1). La regulación de la síntesis proteica es clave para el mantenimiento de la homeostasis y el control de la proliferación celular, asociándose frecuentemente su desregulación con procesos de la malignización celular (Lindqvist, 2018). En este sentido, se ha reportado que la sobreexpresión de algunos factores de traducción contribuye a la oncogénesis, convirtiéndolos en potenciales blancos para la terapia contra el cáncer (Hershey, 2010). En particular, se ha visto que la proteína eEF2, que participa en la elongación de las cadena peptídicas, tiene un rol oncogénico en una gran variedad de tumores y su sobreexpresión ha sido evidenciada en los mismos por IHQ (Oji, 2014). Además, se demostró el valor clínico de eEF2 como biomarcador para la detección del cáncer de próstata mediante IHQ (Zhang, 2017), y para el diagnóstico temprano y la clasificación del cáncer de pulmón de células no pequeñas mediante la determinación de los niveles de la proteína en suero por ELISA (Sun, 2014). Por último, se encontró que los sueros de pacientes con distintos tipos de cáncer presentaban niveles aumentados de anticuerpos anti-eEF2 con respecto a los pacientes sanos y que algunos péptidos derivados de esta proteína eran capaces de estimular respuestas de linfocitos T citotóxicos, indicando que por su

inmunogenicidad eEF2 resultaría un blanco prometedor para la inmunoterapia del cáncer (Oji, 2014).

En contraste con la traducción citoplasmática, cuyo papel ha sido ampliamente estudiado en el contexto cáncer, el papel de la traducción mitocondrial aún no ha sido explorado en profundidad. Entre las proteínas de la maquinaria traduccional mitocondrial se encuentra EF-Tu, GTPasa altamente conservada, identificada aquí por su reactividad cruzada con *T. cruzi*. Se ha demostrado que el *knockdown* de EF-Tu, y por lo tanto la inhibición de la traducción mitocondrial, conduce a la muerte selectiva de células leucémicas por sobre las células normales en un modelo de leucemia mieloide aguda humana, destacándose la proteína como un blanco terapéutico de interés (Škrtić, 2011). A su vez, el rol de las proteínas ribosomales, especialmente de las llamadas proteínas P, también ha sido estudiado en el contexto del cáncer (Artero-Castro, 2011). Se han observado niveles aumentados de RPLP0, a nivel del ARNm en carcinomas hepatocelulares y de colon humanos (Barnard, 1992), y a nivel de la proteína en diversos tumores ginecológicos, proponiéndose su utilidad como marcador pronóstico para estos últimos (Artero-Castro, 2011). Interesantemente, se ha visto que los sueros de pacientes chagásicos presentan anticuerpos que reconocen la región carboxi-terminal de la proteína RPLP0 de *T. cruzi* y estos anticuerpos pueden reconocer también al receptor cardiovascular adrenérgico humano β_1 , ocasionando respuestas autoinmunes que pueden contribuir con el desarrollo de la miocardiopatía chagásica (Ferrari, 1995). Este hecho resalta la necesidad de investigar si existe un potencial riesgo de autoinmunidad asociado a la inmunoterapia antitumoral con *T. cruzi*.

Así como la regulación de la síntesis proteica es esencial para el mantenimiento de la homeostasis, la regulación de la degradación proteica a través

del sistema ubiquitina-proteasoma es igualmente importante. Se ha visto que la disfunción de este sistema está implicada en numerosas enfermedades humanas, incluyendo el cáncer. En particular, el proteasoma está involucrado en la proteólisis de muchos supresores tumorales, por lo que las alteraciones en dicho complejo catalítico pueden conducir a un aumento en la proliferación y la invasividad de las células (Mairinger, 2014). PSMA1, una de las 17 subunidades esenciales del proteasoma 20S, ha sido propuesta como un biomarcador para cáncer de mama tomando como base estudios de proteómica comparativa entre tejido tumoral y el tejido sano adyacente, en donde se muestra que esta proteína se encuentra sobreexpresada en el primer caso (Deng, 2006). Las subunidades alfa del proteasoma, incluyendo PSMA1, se han visto asociadas a la progresión maligna en cánceres humanos y se ha encontrado que los niveles de ARNm de estas proteínas están significativamente aumentados en cánceres gástricos, de vejiga, cabeza y cuello, mama y en todos los tipos de neoplasmas pulmonares neuroendocrinos (Li, 2017; Mairinger, 2014). Cabe destacar que la proteína PSMA1 ha sido identificada como un antígeno inmunogénico específico de cáncer de colon en un estudio que pretendía encontrar antígenos tumorales capaces de inducir respuestas humorales a través del enfrentamiento de las proteínas tumorales, y proteínas del tejido normal, contra el suero del propio paciente mediante western blot bidimensional. Esta estrategia inmuno-proteómica resalta la utilidad tanto de la proteína tumoral como de los anticuerpos que la reconocen, como posibles herramientas para el diagnóstico del cáncer (Yang, 2018).

Un tercer grupo de proteínas sujetas a reactividad cruzada con *T. cruzi* está relacionado con el citoesqueleto y comprende a la actina, la proteína 3 relacionada con la actina (*Actin-Related Protein 3* ó ARP3), la subunidad beta de la proteína

chaperona 1 del complejo T (*T-complex protein 1 subunit beta* ó TCP-1-beta), la proteína 2 relacionada con la dihidropirimidinasa (*dihydropyrimidinase-related protein 2* ó DHYPRP2, también conocida como *Collapsin response mediator protein 2*) y la vimentina. Los citoesqueletos de actina y tubulina juegan un rol clave en ciertos procesos celulares que acompañan la progresión del cáncer, como ser la adquisición de características migratorias e invasoras, la generación de inestabilidad genómica por defectos en la mitosis y la señalización celular (Hall, 2009). Diversos estudios han implicado particularmente a los microfilamentos de actina en la transformación maligna y la migración celular (Holme, 1990). La migración celular es un proceso de múltiples pasos iniciado por la protrusión de la membrana celular, que a su vez requiere de la polimerización regulada de la actina. La protrusión dependiente de actina y la migración de la célula tumoral son considerados eventos determinantes en la transición epitelio-mesenquimal (TEM), que se define como el conjunto de procesos celulares que permiten la conversión de células epiteliales en células mesenquimales (Shankar, 2010). Las células malignas aprovechan estas habilidades migratorias intrínsecas para invadir tejidos adyacentes y la vasculatura, y en última instancia metastatizar. Recientemente, algunos estudios revelaron que las moléculas que vinculan las señales migratorias con el citoesqueleto de actina se encuentran sobreexpresadas en células invasoras y metastásicas en cáncer (Yamaguchi & Condeelis, 2007). Entre ellas se destaca la proteína ARP3, identificada en el presente trabajo por su reactividad cruzada con *T. cruzi*. ARP3 forma complejo con ARP2, actuando ambas en conjunto como agentes nucleantes de la polimerización de los monómeros de actina y controlando la ramificación de los microfilamentos (Otsubo, 2004). La sobreexpresión del complejo ARP2/3 se ha observado en cáncer colorrectal, gástrico, de mama y de pulmón (Otsubo, 2004; Zheng, 2008; Wang, 2004;

Yin, 2015). Además, ARP3 ha sido identificado como un biomarcador de metástasis y de pronóstico desfavorable en cáncer de vejiga (Yang, 2013). Por su parte, la proteína TCP-1, también sujeta a reactividad cruzada con *T. cruzi*, es una chaperona molecular que forma parte del complejo chaperonina que contiene TCP-1 (*Chaperonin Containing TCP-1* ó CCT). Este complejo está involucrado en el plegamiento de las proteínas citoesqueléticas actina y tubulina, y su sobreexpresión ha sido reportada en cáncer colorrectal, mama, y cáncer de pulmón de células pequeñas (Coghlin, 2006; Bassiouni, 2016; Carr, 2017). La inhibición del complejo CCT ha demostrado ser una estrategia terapéutica exitosa en estos dos últimos tipos de cáncer, logrando ejercer un efecto perjudicial sobre los filamentos de actina y tubulina que conduce a la muerte de las células tumorales (Bassiouni, 2016; Carr, 2017).

Continuando con las proteínas asociadas al citoesqueleto, se identificó a la DHYPRP2, cuya función fisiológica es la modulación de la dinámica de los microtúbulos durante el proceso de axonogénesis en las células del sistema nervioso (Wu, 2008). Por otra parte, se ha demostrado que además de su expresión en neuronas y su rol en el establecimiento de la polaridad de estas células, la DHYPRP2 también puede expresarse en células mitóticamente activas no neuronales y estaría involucrada en las vías de regulación de la proliferación de las mismas. Cabe destacar que la DHYPRP2 demuestra colocalización con los microtúbulos, tanto en células neuronales como no neuronales, aunque también puede encontrarse en el citosol y/o asociada a la membrana plasmática (Tahimic, 2006). Se ha visto que la desregulación en la fosforilación de la DHYPRP2 a nivel de ciertos aminoácidos puede conducir a la proliferación celular aberrante y consecuentemente a la tumorigénesis. En este sentido, la DHYPRP2 ha sido identificada como un potencial biomarcador de cáncer colorrectal, según análisis proteómicos comparativos de los secretomas celulares

(Wu, 2008). Asimismo se ha identificado a la DHYPRP2 como candidato a biomarcador específico para cáncer de pulmón de células pequeñas, a través de análisis proteómicos de proteínas asociadas a membrana sobreexpresadas en células tumorales con respecto a células normales. La sobreexpresión de esta proteína también fue verificada mediante IHQ y western blot, y mostró una correlación con la histología del tumor y la supervivencia del paciente (Ocak, 2014).

Por último, entre las proteínas reconocidas por el suero de conejo anti-*T. cruzi* que están asociadas al citoesqueleto se encuentra la vimentina, componente de los filamentos intermedios. La vimentina es considerada como un marcador canónico de la TEM y se ha comprobado su sobreexpresión en una gran variedad de tumores epiteliales, incluyendo próstata, melanoma, mama, pulmón y cánceres gastrointestinales y del sistema nervioso central. Además, la sobreexpresión de la vimentina en cáncer se correlaciona con la aceleración del crecimiento tumoral, la invasión y un peor pronóstico (Satelli, 2011). En el cáncer de pulmón en particular, los filamentos intermedios de vimentina se han visto implicados en muchos aspectos de la iniciación y progresión tumoral, incluyendo la tumorigénesis, la TEM, y la metástasis, y ha sido propuesta como biomarcador diagnóstico y también como un blanco terapéutico de relevancia (Zamay, 2017; Kidd, 2013). Interesantemente, se ha reportado que la vimentina, cuya localización subcelular habitual es citoplasmática, también puede expresarse en la superficie celular en varios tipos de células tumorales (Satelli, 2011; Steinmetz, 2011). Esto ha convertido a la vimentina de superficie celular en un blanco de interés para el tratamiento con anticuerpos monoclonales (Noh, 2016) y en un marcador de utilidad para la detección de células tumorales circulantes (CTCs) mesenquimales (Satelli, 2015; 2017). Por otra parte, anticuerpos anti-vimentina, inducidos por la infección con *T. cruzi*, han sido encontrados en sueros de pacientes

con enfermedad chagásica aguda, y se proponen como marcadores de daño muscular cardíaco autoinmune. Cabe mencionar, a su vez, que no se ha evidenciado la expresión de vimentina por parte del parásito (Nascimento, 2018).

Las últimas dos proteínas que fueron identificadas por espectrometría de masas incluyen la S-formil glutatión hidrolasa (también llamada esterasa D) y la peptidil-prolil cis-trans isomerasa D isoforma 1 (Pin 1). El rol de la S-formil glutatión hidrolasa en el cáncer no ha sido investigado de forma extensa. Esta enzima está involucrada en el proceso de detoxificación del formaldehído y ha sido identificada como biomarcador pronóstico de respuesta a la terapia de primera línea en leucemia mieloide aguda, dónde concentraciones más altas de la enzima correlacionan con una mayor probabilidad de lograr una remisión completa (Każmierczak, 2013). Por otra parte, Pin 1, cuya función está vinculada con procesos de señalización celular, ha sido vinculada al cáncer en numerosos trabajos. Específicamente, esta enzima tiene la capacidad de isomerizar el enlace formado por residuos de prolina precedidos por una serina o treonina fosforilada (motivos fosfo-Ser/Thr-Pro). La fosforilación de las proteínas sobre motivos Ser/Thr-Proes un mecanismo de señalización clave en diversos procesos fisiológicos y patológicos, por lo que la enzima Pin 1 regula cambios conformacionales que pueden alterar distintas vías de señalización celular (Lee, 2011). En este sentido, se ha demostrado que Pin 1 puede modular la actividad catalítica, el estado de fosforilación, las interacciones proteína-proteína, la localización subcelular y la estabilidad proteica de sus sustratos, así como participar en procesos de diferenciación y proliferación celular (Campaner, 2017). La sobreexpresión de Pin 1 fue descrita para los principales tipos de tumores incluyendo próstata, mama, cérvix, pulmón y colon (Bao, 2004), y ha demostrado tener la capacidad de alterar el balance celular a través de la activación de más de 40

oncogenes y la inactivación de más de 20 supresores tumorales (Zhou & Lu, 2016). Además, los polimorfismos en el gen de Pin 1 que disminuyen su expresión se asocian con un menor riesgo para múltiples tipos de cáncer, y ratones deficientes en Pin 1 han demostrado una importante resistencia a la tumorigénesis, incluso cuando ciertos oncogenes eran sobreexpresados o ciertos supresores tumorales eran eliminados (Zhou & Lu, 2016). Asimismo, Pin 1 ha sido estudiada como blanco molecular en cáncer de próstata, donde la inhibición de la misma mediante ARN interferente condujo a la supresión del crecimiento tumoral (Ryo, 2005). En general, se ha visto que los inhibidores de Pin 1 tienen el potencial de reestablecer el balance celular al bloquear simultáneamente distintas vías que conducen al cáncer, representando una estrategia conveniente en el tratamiento de tumores agresivos y resistentes a las drogas de uso tradicional (Zhou & Lu, 2016).

En suma, a través de un abordaje immuno-proteómico, se identificaron 14 proteínas de la línea celular LL/2 reconocida por un suero de conejo anti-*T. cruzi*, las cuales, en su mayoría, han sido vinculadas con la transformación celular maligna y han sido propuestas como potenciales blancos terapéuticos y/o biomarcadores específicos para distintos tipos de cáncer. Entre las proteínas identificadas, la DHYPRP2 y la vimentina son las únicas para las que se ha descrito una localización superficial en células tumorales. El reconocimiento de estos antígenos de superficie celular por anticuerpos específicos podría desencadenar mecanismos de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC). La ADCC representa uno de los principales mecanismos efectores antitumorales del sistema inmune (Murphy, 2008), y podría estar implicada en la inmunoterapia con *T. cruzi*. La relevancia de la respuesta humoral en el efecto oncoprotector inducido por este parásito ya ha sido demostrada en trabajos que indicaron que la actividad antitumoral frente al carcinoma

de Ehrlich en animales inmunizados con lisados de *T. cruzi* se relaciona directamente con los niveles de anticuerpos específicos contra el parásito (Kallinikova, 2006).

Por otra parte, el reconocimiento de antígenos tumorales específicos por un suero de conejo anti-*T. cruzi* abre horizontes en el terreno del diagnóstico tumoral. Estrategias inmuno-proteómicas similares a la utilizada en el presente trabajo, en donde se enfrentaron las proteínas tumorales, y proteínas del tejido normal, contra el suero del propio paciente mediante western blot bidimensional permitieron identificar a la proteína PSMA1 como un biomarcador específico de cáncer de colon (Yang, 2018). Este trabajo resalta la utilidad de la proteína tumoral y de los anticuerpos que la reconocen, como herramientas valiosas en el diagnóstico del cáncer.

A los efectos de determinar si alguno de los antígenos identificados aquí podría tener una utilidad potencial como biomarcador tumoral, sería necesario evaluar el reconocimiento de tejidos normales por los anticuerpos anti-*T. cruzi*, a modo de control. Cabe destacar que para la mayoría de los tipos de tejidos humanos no tumorales no se ha observado reconocimiento por el suero anti-*T. cruzi* (Tramontin, 2018).

5.3 Evaluación de la presencia de motivos carbohidratos compartidos entre *Trypanosoma cruzi* y células LL/2, mediante el reconocimiento por lectinas

Mediante los ensayos de ELLA y lectin blot se pudo comprobar que tanto las células LL/2 como *T. cruzi* comparten motivos carbohidratos de ácido siálico [α NeuNAC(2→6/2→3)gal] y fucosa (α -L-fuc), que fueron reconocidos por las lectinas SNA y UEA-I respectivamente. El interés en el estudio de los antígenos carbohidratos surge de resultados preliminares de nuestro grupo que indican que la oxidación de los azúcares del extracto parasitario causa la pérdida de su efecto antitumoral *in vivo* en el modelo LL/2.

Como fue mencionado en la introducción, la sialilación y fucosilación aumentadas representan características distintivas de la transformación celular maligna en el contexto de la glicosilación aberrante en cáncer (Blanas, 2018). Particularmente, la sobreexpresión de ácido siálico terminal en las cadenas glucídicas de las moléculas de superficie celular, ha sido correlacionada con la progresión, la propagación metastásica y un peor pronóstico en cánceres humanos (Hedlund, 2008). En este sentido, la sialilación aumentada en glicoproteínas de membrana ha demostrado tener un rol importante en la adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular en carcinomas mamarios (Wang, 2006; Lin, 2002), y en la propagación metastásica y la resistencia a la terapia en cáncer colorrectal (Park, 2013). La lectina SNA, utilizada en este trabajo, reconoce ácido siálico unido por enlace $\alpha 2 \rightarrow 6$, y $\alpha 2 \rightarrow 3$, aunque este último en menor medida, y ha sido propuesta como una herramienta para la detección del carcinoma ductal invasivo de mama por ensayos de histoquímica (dos-Santos, 2014). Además de los tipos de cáncer ya mencionados, la sobreexpresión del ácido siálico unido por enlace $\alpha 2 \rightarrow 6$ en N-glicanos ha sido reportada para carcinomas de cérvix, coriocarcinomas, leucemia mieloide aguda y algunos tumores cerebrales (Hedlund, 2008).

La síntesis de ácido siálico en mamíferos se da a través de una vía compleja, que involucra los productos de más de 32 genes. *T. cruzi*, por su parte, ha evolucionado para obtener el ácido siálico desde su hospedero mamífero a través de la enzima trans-sialidasa (TS) (Freire-de-Lima, 2012). La TS le permite al parásito una sialilación rápida de su superficie cuando es provisto de ácido siálico $\alpha 2 \rightarrow 3$ -linked proveniente de glicoconjugados en el suero o en las superficies celulares del hospedero. La sialilación contribuye a la supervivencia de *T. cruzi* dado que representa una estrategia de evasión del sistema inmune del hospedero, a la vez que

favorece la infectividad del parásito (Freire-de-Lima, 2012; Tomlinson, 1994). En el presente trabajo, los parásitos utilizados no tienen interacción con ningún hospedero, por lo que se interpreta que el ácido siálico detectado es obtenido los mismos mediante la TS desde moléculas sialiladas presentes en el medio de cultivo. Éste fenómeno ya ha sido reportado para epimastigotas de *T. cruzi* (Previato, 1985).

Así como la sialilación, la fucosilación es una de las modificaciones glucídicas más importantes en procesos inflamatorios y cáncer (Miyoshi, 2012). Una de las funciones mejor estudiadas para la fucosa es su rol como componente esencial de ligandos carbohidratos para las moléculas de adhesión celular conocidas como selectinas, entre los que se destaca el antígeno sialil-LewisX (SLe^x). Estas interacciones, que son esenciales para el reclutamiento adecuado de neutrófilos y linfocitos T a los sitios de inflamación, también resultan cruciales para la progresión del cáncer. Las células tumorales, liberadas hacia la sangre desde el tumor primario, suelen sobreexpresar glicanos sialilados y fucosilados en su superficie. Su interacción con las selectinas endoteliales imita a la cascada de adhesión inflamatoria, iniciando la extravasación y colonización de nuevos tejidos para formar tumores secundarios. Avances recientes en glicómica han identificado varios tipos de glico-biomarcadores, conteniendo motivos fucosilados, que podrían resultar útiles en el diagnóstico de ciertos tipos de cáncer (Miyoshi, 2012). En este sentido, existen estudios que demuestran la sobreexpresión de glicanos fucosilados en algunas glicoproteínas específicas de sueros de pacientes con cáncer de pulmón (Kossowska, 2005). Asimismo, la actividad aumentada de distintas fucosil-transferasas ha sido evidenciada en numerosos tipos de tumores malignos, incluyendo hígado, cabeza y cuello, ovario, tiroides, y cánceres colorrectales. Además, se ha reportado que la sobreexpresión de las fucosil-transferasas se correlaciona con la propagación

metastásica, la recurrencia tumoral y una baja supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (Chen, 2013; Desiderio, 2015). Por último, se encontró una relación estadísticamente significativa entre el *score* de tinción histoquímica con la lectina *Aleuria aurantia* (ALL), que reconoce L-fucosa, y la invasión vascular, el potencial metastásico y el estadio clínico en cáncer colorrectal (Osuga, 2016).

Para *T. cruzi*, se ha descrito que una fracción minoritaria de los N-glicanos de los glicoconjugados del parásito contiene α -L-fucosa en su estructura (Turnock & Ferguson, 2007). En particular, dos glicoproteínas de superficie de *T. cruzi* han demostrado presentar α -L-fucosa: la glicoproteína de la familia Tc-85 (específica del estadio tripomastigota), implicada en la adhesión celular, y la Gp-72 (específica de los estadios epimastigota y tripomastigota metacíclico) (Barboza, 2005; Miletti, 2003).

En suma, los antígenos carbohidratos asociados a tumor (TACAs por sus siglas en inglés), y los glicanos en general, pueden ser considerados como pan-antígenos, dado que forman parte de la estructura de muchas proteínas y lípidos que participan de distintos procesos en las células tumorales. Considerando que múltiples moléculas en las células tumorales se encuentran modificadas con las mismas estructuras carbohidratos y que el reconocimiento de TACAs está asociado con los mecanismos de inmunovigilancia frente al cáncer, los TACAs se convierten en blancos estratégicos para la inmunoterapia del cáncer (Kieber-Emmons, 2017).

En este sentido, la inmunización activa con antígenos carbohidratos para la supresión del crecimiento tumoral *in vivo* ha sido objeto de numerosas investigaciones, obteniéndose resultados favorables (Hakomori, 1991; Cunto-Amesty, 2001). Los anticuerpos que reconocen TACAs, ya sean anticuerpos naturales o inducidos por vacunas, han demostrado propiedades oncolíticas en numerosos

trabajos (Kieber-Emmons, 2017). También se ha observado que los anticuerpos pueden sustituir a las lectinas endógenas en la interacción con glicanos sobreexpresados en receptores de muerte celular y en otras glicoproteínas de membrana, mediando la apoptosis de la célula tumoral (Lichtenstein & Rabinovich, 2013; Kieber-Emmons, 2017).

Estos antecedentes en inmunoterapia del cáncer dirigida a TACAs permiten explicar, al menos en parte, por qué el extracto de *T. cruzi* disminuye su actividad antitumoral *in vivo* cuando sus azúcares son oxidados (Freire, datos no publicados).

6. CONCLUSIONES

A continuación, se detallan las principales conclusiones extraídas del presente trabajo:

- Mediante abordajes técnicos complementarios, incluyendo IHQ, IFI, citometría de flujo y western blot, se pudo comprobar que un suero de conejo anti-*T. cruzi* es capaz de reconocer antígenos en las células LL/2 de forma diferencial al suero de conejo pre-inmune, demostrando la existencia de reactividad cruzada entre el parásito y esta línea celular tumoral
- A través de ensayos de western blot bidimensional y espectrometría de masas se identificaron 14 proteínas de LL/2 sujetas a reactividad cruzada con *T. cruzi*.
- Mediante ensayos de ELLA y lectin blot, se evidenció que las lectinas SNA y UEA-I reconocen glicoconjugados tanto en extractos de células LL/2 como de *T. cruzi*, demostrando la presencia de motivos carbohidratos conteniendo ácido siálico y fucosa compartidos.

En suma, este trabajo se propuso ampliar el conocimiento acerca de la reactividad cruzada *T. cruzi*-cáncer y de los antígenos involucrados en la misma. Los resultados obtenidos contribuyen a la comprensión del sistema cáncer-parásito, en el marco de la inmunoterapia antitumoral con *T. cruzi*, que constituye una de las principales líneas de investigación de nuestro grupo.

7. REFERENCIAS

- Aguirre-Ghiso, JA.** (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer*, 7(11):834-46.
- Akbari B., Farajnia, S., Ahdi Khosroshahi, S., Safari, F., Yousefi, M., Dariushnejad, H., Rahbarnia, L.** (2017). Immunotoxins in cancer therapy: Review and update. *Int Rev Immunol.*, 1:1-13.
- Akgul, H., Tez, M., Unal, AE., et al.** (2003). Echinococcus against cancer: why not?. *Cancer*, 98:1999– 2000.
- Albert, M. et al.** (1998). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via $\alpha\text{v}\beta 5$ and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 188, 1359–1368.
- 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.
- Artero-Castro, A., Castellvi, J., García, A., Hernández, J., Cajal, S. R. y, & LLeonart, M. E.** (2011). Expression of the ribosomal proteins Rplp0, Rplp1, and Rplp2 in gynecologic tumors. *Human Pathology*, 42(2), 194–203.
- Atayde, VD., Jasiulionis, MG., 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(3):172-83.
- Atwood, J. A., Weatherly, D. B., Minning, T. A., Bundy, B., Cavola, C., Oppendoes, F. R., Orlando, R., Tarleton, R. L.** (2005). The Trypanosoma cruzi Proteome. *Science*, 309(5733):473-476.
- Baird, JR., Fox, BA., Sanders, KL., Lizotte, PH., Cubillos-Ruiz, JR., Scarlett, UK., Rutkowski, MR., Conejo-Garcia, JR., Fiering, S., Bzik, DJ.** (2013). Avirulent Toxoplasma gondii generates therapeutic antitumor immunity by reversing immunosuppression in the ovarian cancer microenvironment. *Cancer Res.*, 1;73(13):3842-51.
- Banchereau, J. & Steinman, R.** (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392, 245–252.
- Bao, L., Kimzey, A., Sauter, G., Sowadski, J. M., Lu, K. P., & Wang, D.-G.** (2004). Prevalent Overexpression of Prolyl Isomerase Pin1 in Human Cancers. *The American Journal of Pathology*, 164(5), 1727–1737.

- Barboza, M., Duschak, V. G., Fukuyama, Y., Nonami, H., Erra-Balsells, R., Cazzulo, J. J., & Couto, A. S.** (2005). Structural analysis of the N-glycans of the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Journal*, 272(15), 3803–3815.
- Barnard, G. F., Staniunas, R. J., Bao, S., Mafune, K., Steele, G. D., Gollan, J. L., & Chen, L. B.** (1992). Increased expression of human ribosomal phosphoprotein P0 messenger RNA in hepatocellular carcinoma and colon carcinoma. *Cancer Research*, 52(11), 3067–3072.
- Barrios, E., Musetti, C., Alonso, R., Garau, M. V.** (2015). Atlas de mortalidad por cáncer en el Uruguay 2009-2013. Montevideo: Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer.
- Bassiouni, R., Nemeč, K. N., Iketani, A., Flores, O., Showalter, A., Khaled, A. S., ... Khaled, A. R.** (2016). Chaperonin Containing TCP-1 Protein Level in Breast Cancer Cells Predicts Therapeutic Application of a Cytotoxic Peptide. *Clinical Cancer Research*, 22(17), 4366–4379.
- Basu, S., Binder, R. J., Ramalingam, T. & Srivastava, P. K.** (2001). CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity*, 14, 303–313.
- Baumgarth, N., Tung, J. W., & Herzenberg, L. A.** (2005). Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. *Springer Seminars in Immunopathology*, 26(4), 347–362.
- Bedard, P. L., Hansen, A. R., Ratain, M. J., & Siu, L. L.** (2013). Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature*, 501(7467), 355–364.
- Campaner, E., Rustighi, A., Zannini, A., Cristiani, A., Piazza, S., Ciani, Y., ... Del Sal, G.** (2017). A covalent PIN1 inhibitor selectively targets cancer cells by a dual mechanism of action. *Nature Communications*, 8, 15772.
- Blanas, A., Sahasrabudhe, N. M., Rodríguez, E., van Kooyk, Y., & van Vliet, S. J.** (2018). Fucosylated Antigens in Cancer: An Alliance toward Tumor Progression, Metastasis, and Resistance to Chemotherapy. *Frontiers in Oncology*, 8, 39.
- Bouvard, V; Baan, R; Straif, K; Grosse, Y; Secretan, B; El Ghissassi, F; Benbrahim-Tallaa, L; Guha, N; et al.** (2009). "A review of human carcinogens - Part B: biological agents". *The Lancet*, 10 (4): 321–322.
- Burnet F. M.** (1970). The concept of immunological surveillance. Progress in *Experimental Tumor Research*, 13: 1-27.
- Burnet, F. M.** (1957). Cancer – A biological approach. *British Medical Journal*, 1(5022):779-86.
- Buscaglia, C., Campo, V., Frasch, A., Di Noia, J.** (2006). *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 4: 229-236.

- Cantor, J. R., & Sabatini, D. M.** (2012). Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer Discovery*, 2(10), 881–898.
- Capitini, C. M., Fry, T. J., & Mackall, C. L.** (2009). Cytokines as Adjuvants for Vaccine and Cellular Therapies for Cancer. *American Journal of Immunology*, 5(3), 65–83.
- Carr, A. C., Khaled, A. S., Bassiouni, R., Flores, O., Nierenberg, D., Bhatti, H., ... Khaled, A. R.** (2017). Targeting chaperonin containing TCP1 (CCT) as a molecular therapeutic for small cell lung cancer. *Oncotarget*, 8(66), 110273–110288.
- Casaravilla, C., Freire, T., Malgor, R., Medeiros, A., Osinaga, E., Carmona, C.** (2003b). Mucin-type O-glycosylation in helminth parasites from major taxonomic groups: evidence for widespread distribution of the Tn antigen (GalNAc-Ser/Thr) and identification of UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase activity. *Journal of Parasitology*, 89(4): 709-714.
- Casaravilla, C., Malgor, R., Carmona, C.,** (2003a). Characterization of carbohydrates of adult *Echinococcus granulosus* by lectin-binding analysis. *Journal of Parasitology*, 89(1): 57-61.
- Chae, Y. K., Arya, A., Iams, W., Cruz, M. R., Chandra, S., Choi, J., & Giles, F.** (2018). Current landscape and future of dual anti-CTLA4 and PD-1/PD-L1 blockade immunotherapy in cancer; lessons learned from clinical trials with melanoma and non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 6(1), 39.
- Chen L, He Z, Qin L, Li Q, Shi X, Zhao S, et al.** (2011). Antitumor Effect of Malaria Parasite Infection in a Murine Lewis Lung Cancer Model through Induction of Innate and Adaptive Immunity. *PLoS ONE*, 6(9): e24407.
- Chen, C.-Y., Jan, Y.-H., Juan, Y.-H., Yang, C.-J., Huang, M.-S., Yu, C.-J., ... Wong, C.-H.** (2013). Fucosyltransferase 8 as a functional regulator of nonsmall cell lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(2), 630–635.
- Chikuma, S.** (2016). Basics of PD-1 in self-tolerance, infection, and cancer immunity. *Int. J. Clin. Oncol.*, 221:448-55
- Coghlin, C., Carpenter, B., Dundas, S., Lawrie, L., Telfer, C., & Murray, G.** (2006). Characterization and over-expression of chaperonin t-complex proteins in colorectal cancer. *The Journal of Pathology*, 210(3), 351–357.
- Croci, D.O., Zacarías Fluck, M.F., Rico, MJ., Matar, P., Rabinovich, G.A., Scharovsky, O.G.** (2007). Dynamic cross-talk between tumor and immune cells in orchestrating the immunosuppressive network at the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother.*, 56:1687-700.
- Cunto-Amesty, G., Dam, T. K., Luo, P., Monzavi-Karbassi, B., Brewer, C. F., Van Cott, T. C., & Kieber-Emmons, T.** (2001). Directing the immune response to carbohydrate antigens. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(32), 30490–30498.

- Darani, H.Y., Yousefi, M.** (2012). Parasites and cancers: parasite antigens as possible targets for cancer immunotherapy. *Future Oncol.*, 8(12):1529-35.
- D'Avila, H., Toledo, DA., Melo, RC.** (2012). Lipid bodies: inflammatory organelles implicated in host-Trypanosoma cruzi interplay during innate immune responses. *Mediators of Inflammation*. 478601.
- DeBerardinis, R. J.** (2011). Serine metabolism: some tumors take the road less traveled. *Cell Metabolism*, 14(3), 285–286.
- Deng, S.-S., Xing, T.-Y., Zhou, H.-Y., Xiong, R.-H., Lu, Y.-G., Wen, B., ... Yang, H.-J.** (2006). Comparative Proteome Analysis of Breast Cancer and Adjacent Normal Breast Tissues in Human. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 4(3), 165–172.
- Desiderio, V., Papagerakis, P., Tirino, V., Zheng, L., Matossian, M., Prince, M. E., ... Papagerakis, S.** (2015). Increased fucosylation has a pivotal role in invasive and metastatic properties of head and neck cancer stem cells. *Oncotarget*, 6(1), 71–84.
- 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.
- Díaz-Zaragoza, M., Hernández-Ávila, R., Viedma-Rodríguez, R., Arenas-Aranda, D., Ostoa-Saloma, P.** (2015). Natural and adaptive IgM antibodies in the recognition of tumor-associated antigens of breast cancer. *Oncol Rep.*; 34(3):1106-14.
- Diefenbach, A. & Raulet, D.** (2002). The innate immune response to tumors and its role in the induction of T-cell immunity. *Immunol. Rev.*, 188, 9–21.
- Dighe, AS., Richards, E., Old, LJ., Schreiber, RD.** (1994). Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*, 1(6):447-56.
- dos-Santos, P. B., Zanetti, J. S., Vieira-de-Mello, G. S., Rêgo, M. B. M., Ribeiro-Silva A, A., & Beltrão, E. I. C.** (2014). Lectin histochemistry reveals SNA as a prognostic carbohydrate-dependent probe for invasive ductal carcinoma of the breast: a clinicopathological and immunohistochemical auxiliary tool. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(5), 2337–2349.
- Drake, C. G., Jaffee, E. & Pardoll, D. M.** (2006). Mechanisms of immune evasion by tumors. *Advances in Immunology*, 90: 51-81.
- Dranoff, G.** (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 4: 11-22.
- Driessens, G., Kline, J., Gajewski T. F.** (2009). Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity. *Immunol Rev.*, 229(1): 126–144.

- 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** (2004b). The three Es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology* 22: 329-360.
- Ehrlich, P.** (1909). Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, 5:273-290.
- Fainboim, L., Geffner, J.** (2011). Introducción a la inmunología humana. Editorial Panamericana. 6ta Edición, cap 18: *Inmunidad y cáncer*.
- Ferrari, I., Levin, M. J., Wallukat, G., Elies, R., Lebesgue, D., Chiale, P., ... Hoebeke, J.** (1995). Molecular mimicry between the immunodominant ribosomal protein P0 of *Trypanosoma cruzi* and a functional epitope on the human beta 1-adrenergic receptor. *The Journal of Experimental Medicine*, 182(1), 59–65.
- Finn, O.J.** (2012). Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer *Annals of Oncology*, Volume 23, viii6–viii9.
- Freire, T., Robello, C., Soulé, S., Ferreira, F. & Osinaga, E.** (2003). Sialyl-Tn antigen expression and O-linked GalNAc-Thr synthesis by *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and biophysical research communications*, 312: 1309-1316.
- Freire-de-Lima, L., Oliveira, I. A., Neves, J. L., Penha, L. L., Alisson-Silva, F., Dias, W. B., & Todeschini, A. R.** (2012). Sialic acid: a sweet swing between mammalian host and *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Immunology*, 3, 356.
- Fried, B. Reddy, A. Mayer, D.** (2011). Helminths in human carcinogenesis, *Cancer Letters*, 305;2: 239–249.
- 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.
- García, S B et al.** (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* [online]. 45(2): 91-93.
- Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A., Kuby, J.** (2003). Immunology. Nueva York, Editorial W. H. Freeman and Company. 5ta Ed. Cap 22: Cancer and the Immune System. 501-524.
- Gaude, E., & Frezza, C.** (2014). Defects in mitochondrial metabolism and cancer. *Cancer & Metabolism*, 2, 10.

- Hakomori, S.** (1991). Possible functions of tumor-associated carbohydrate antigens. *Current Opinion in Immunology*, 3(5), 646–653.
- 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.
- Hall, A.** (2009). The cytoskeleton and cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 28(1–2), 5–14.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A.** (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(56):646-74.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A.** (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57–70.
- Hedlund, M., Ng, E., Varki, A., & Varki, N. M.** (2008). 2-6 Linked Sialic Acids on N-Glycans Modulate Carcinoma Differentiation In vivo. *Cancer Research*, 68(2), 388–394.
- Hershey, J. W. B.** (2010). Regulation of protein synthesis and the role of eIF3 in cancer. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 43(10), 920–930.
- Holme, T. C.** (1990). Cancer cell structure: actin changes in tumour cells--possible mechanisms for malignant tumour formation. *European Journal of Surgical Oncology : The Journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*, 16(2), 161–169.
- Juang, H.H.** (2004). "Modulation of mitochondrial aconitase on the bioenergy of human prostate carcinoma cells". *Molecular Genetics and Metabolism*. 81 (3): 244–52.
- Kallinikova, V.D., Borisova, E.N., Pakhorukova, L.V. et al.** (2006). Immunization against *Trypanosoma cruzi* and tumor growth in mice. *Med. Parazitol. (Mosk)*, (4), 9–12.
- Kaplan, D. et al.** (1998). Demonstration of an interferon γ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 7556–7561.
- Karagas, M.R., Weinstock, M.A., Nelson, H.H.** (2006). Keratinocyte Carcinomas. *Cancer epidemiology and prevention. 3rd Ed. Oxford University Press*; 1230–50.
- Karre, K.** (2002). NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scan. J. Immunol.*, 55, 221–228.
- Kaufman, H. L.** (2012). Vaccines for Melanoma and Renal Cell Carcinoma. *Semin. Oncol.*, 39:263-275.
- Kaura, B., Bagga, R., Patel, F.D.** (2004). "Evaluation of the pyruvate kinase isoenzyme tumor (Tu M2-PK) as a tumor marker for cervical carcinoma". *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 30 (3): 193–196.
- Kaźmierczak, M., Luczak, M., Lewandowski, K., Handschuh, L., Czyż, A., Jarmuż, M., ... Komarnicki, M.** (2013). Esterase D and gamma 1 actin level might predict results of induction therapy in patients with acute myeloid leukemia without and with maturation. *Medical Oncology*, 30(4), 725.

- Kennedy, J.D.** (1992). Extrathymic T cell maturation. Phenotypic analysis of T cell subsets in nude mice as a function of age. *J Immunol.*, 15;148(6):1620-9.
- Khan, A.H., Sadroddiny, E.** (2015). Licensed monoclonal antibodies and associated challenges. *Hum Antibodies.* 23:63-72.
- Kieber-Emmons, T., Monzavi-Karbassi, B., Hutchins, L. F., Pennisi, A., & Makhoul, I.** (2017). Harnessing benefit from targeting tumor associated carbohydrate antigens. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 13(2), 323–331.
- Kim, C.W., Kim, J.I., Park, S.H., et al.** (2003). Usefulness of plasma tumor M2-pyruvate kinase in the diagnosis of gastrointestinal cancer. *The Korean journal of gastroenterology.* 42 (5): 387–93.
- 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.
- Kossowska, B., Ferens-Sieczkowska, M., Gancarz, R., Passowicz-Muszyńska, E., & Jankowska, R.** (2005). Fucosylation of serum glycoproteins in lung cancer patients. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 43(4), 361–369.
- La Thangue, N. B., & Kerr, D. J.** (2011). Predictive biomarkers: a paradigm shift towards personalized cancer medicine. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 8(10), 587–596.
- Lauwaet, T., Oliveira, M., Mareel, M., Leroy A.** (2000). Molecular mechanisms of invasion by cancer cells, leukocytes and microorganisms. *Microbes and Infection*, 2: 923-031.
- Lee, T. H., Pastorino, L., & Lu, K. P.** (2011). Peptidyl-prolyl cis–trans isomerase Pin1 in ageing, cancer and Alzheimer disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 13, e21.
- Li, L., Wei, Y., To, C., Zhu, C.-Q., Tong, J., Pham, N.-A., ... Moran, M. F.** (2014). Integrated Omic analysis of lung cancer reveals metabolism proteome signatures with prognostic impact. *Nature Communications*, 5(1), 5469.
- Li, Y., Huang, J., Sun, J., Xiang, S., Yang, D., Ying, X., ... Ren, G.** (2017). The transcription levels and prognostic values of seven proteasome alpha subunits in human cancers. *Oncotarget*, 8(3), 4501–4519.
- Lichtenstein, R. G., & Rabinovich, G. A.** (2013). Glycobiology of cell death: when glycans and lectins govern cell fate. *Cell Death and Differentiation*, 20(8), 976–986.
- Lin, S., Kemmer, W., Grigull, S., & Schlag, P. M.** (2002). Cell Surface α 2,6-Sialylation Affects Adhesion of Breast Carcinoma Cells. *Experimental Cell Research*, 276(1), 101–110.
- Lindqvist, L. M., Tandoc, K., Topisirovic, I., & Furic, L.** (2018). Cross-talk between protein synthesis, energy metabolism and autophagy in cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, 48, 104–111.

- López, NC., Valck, C., Ramírez, G., Rodríguez, M., Ribeiro, C., Orellana, J., Maldonado, I., Albini, A., Anacona, D., Lemus, D., Aguilar, L., Schwaeble, W., Ferreira, A.** (2010). Antiangiogenic and antitumor effects of *Trypanosoma cruzi* Calreticulin. *PLoS Negl Trop Dis.*, 4(7):e730.
- Lüftner, D., Mesterharm, J., Akrivakis, C., Geppert, R., Petrides, PE., Wernecke. KD, Possinger, K.** (2000). "Tumor M2-pyruvate kinase expression in advanced breast cancer". *Anticancer Res.* 20 (6D): 5077–5082.
- Mairinger, F. D., Walter, R. F. H., Theegarten, D., Hager, T., Vollbrecht, C., Christoph, D. C., ... Wohlschlaeger, J.** (2014). Gene Expression Analysis of the 26S Proteasome Subunit PSMB4 Reveals Significant Upregulation, Different Expression and Association with Proliferation in Human Pulmonary Neuroendocrine Tumours. *Journal of Cancer*, 5(8), 646–654.
- Maizels, R. M., Balic, A., Gomez-Escobar, N., Nair, M., Taylor, M. D., Allen, J.E.** (2004). Helminth parasites-masters of regulation. *Immunological Reviews*, 201: 89-116.
- Marusyk, A., Almendro, V., Polyak, K.** (2012). Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nature Reviews. Cancer*, 12(5):323-34.
- Mazurek, S.** (2011). Pyruvate kinase type M2: A key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(7), 969–980.
- Meínikov, V. G., Fierro Velasko, F. H., Dobrovinskaya, O.R.** (2004). Suppression of growth and metastasizing of T-cell lymphoma in mice infected with american trypanosomiasis at different stages of experimental infection. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 137: 475-478.
- Mellman, I., Coukos, G., Dranoff, G.** (2011). Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*, 480: 480–489.
- Miletti, L. C., Almeida-de-Faria, M., Colli, W., & Alves, M. J. M.** (2003). Immunocytochemical and biochemical detection of alpha-L-fucosidase in *Trypanosoma cruzi*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36(5), 595–603.
- Miyoshi, E., Moriwaki, K., Terao, N., Tan, C.-C., Terao, M., Nakagawa, T., ... Kamada, Y.** (2012). Fucosylation Is a Promising Target for Cancer Diagnosis and Therapy. *Biomolecules*, 2(1), 34–45.
- Monin, L.** (2011). Evaluación de respuestas inmunitarias anti-tumorales por antígenos de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, PEDECIBA.
- Munkley, J., Elliott, D.J.** (2016). Hallmarks of glycosylation in cancer. *Oncotarget*, 7;7(23):35478-89.
- Murphy, K., Travers, P. & Walport, M.** (2008). *Janeway's Immunobiology*. Nueva York, Editorial Garland Science. 7ma Edición.

- Myc, L.A., Gamian A. & Myc A.** (2011). Cancer vaccines. Any Future?. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 59: 249-259.
- Nascimento, M. S., Stolf, A. M. S., Andrade Junior, H. F. de, Pandey, R. P., Umezawa, E. S., Nascimento, M. S., ... Umezawa, E. S.** (2018). Vimentin and Anti Vimentin Antibodies in Chagas' Disease. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 110(4), 348–353.
- Ni, L., Dong, C.** (2017). New checkpoints in cancer immunotherapy. *Immunol Rev.*, 276:52-65.
- Noh, H., Yan, J., Hong, S., Kong, L.-Y., Gabrusiewicz, K., Xia, X., ... Li, S.** (2016). Discovery of cell surface vimentin targeting mAb for direct disruption of GBM tumor initiating cells. *Oncotarget*, 7(44), 72021–72032.
- Ocak, S., Friedman, D. B., Chen, H., Ausborn, J. A., Hassanein, M., Detry, B., ... Massion, P. P.** (2014). Discovery of New Membrane-Associated Proteins Overexpressed in Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 9(3), 324–336.
- Oji, Y., Tatsumi, N., Fukuda, M., Nakatsuka, S.-I., Aoyagi, S., Hirata, E., Sugiyama, H.** (2014). The translation elongation factor eEF2 is a novel tumor associated antigen overexpressed in various types of cancers. *International Journal of Oncology*, 44(5), 1461–1469.
- Old, L. & Chen, Y.-T.** (1998). New paths in human cancer serology. *J. Exp. Med.*, 187, 1163–1167.
- 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.
- Oremek, G.M., Teigelkamp, S., Kramer, W., Eigenbrodt, E., Usadel, K.H.** (1999). "The pyruvate kinase isoenzyme tumor M2 (Tu M2-PK) as a tumor marker for renal carcinoma". *Anticancer Res.* 19 (4A): 2599–2601.
- Osinaga, E.** (2007). Expression of Cancer-associated Simple Mucin-type O-glycosylated Antigens in Parasites. *IUBMB Life*, 59: 269-273.
- Osuga, T., Takimoto, R., Ono, M., Hirakawa, M., Yoshida, M., Okagawa, Y., ... Kato, J.** (2016). Relationship Between Increased Fucosylation and Metastatic Potential in Colorectal Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 108(9), djw210.
- Otsubo, T., Iwaya, K., Mukai, Y., Mizokami, Y., Serizawa, H., Matsuoka, T., & Mukai, K.** (2004). Involvement of Arp2/3 complex in the process of colorectal carcinogenesis. *Modern Pathology*, 17(4), 461–467.
- Park, J.-J., & Lee, M.** (2013). Increasing the α 2, 6 sialylation of glycoproteins may contribute to metastatic spread and therapeutic resistance in colorectal cancer. *Gut and Liver*, 7(6), 629–641.

- 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.
- Pitt, J.M., Vétizou, M., Daillère, R., Roberti, M.P., Yamazaki, T., Routy, B., Lepage, P., Boneca, I.G., Chamaillard, M., Kroemer, G., Zitvogel, L.** (2016). Resistance Mechanisms to Immune-Checkpoint Blockade in Cancer: Tumor-Intrinsic and -Extrinsic Factors. *Immunity*, 44(6):1255-69.
- Plummer, M., de Martel, C., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., Franceschi, S.** (2016). Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Health*, 4(9):e609-16.
- Previato, J., Andrade, A. F. B., Pessolani, M. C. V., & Mendonça-Previato, L.** (1985). Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for a new metabolic route. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 16(1), 85–96.
- Rabinovich, G., Sotomayor, E.M.** (2007). Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annual Review of Immunology*, 25: 267-296.
- Roskin G., Exemplarskaia, E.** (1931). Protozoeninfektion und experimenteller Krebs. I. Mitteilung. *Zeitschrift für Krebsforschung*, 34:628-645.
- Roskin, G., Romanova, K.** (1935). Action des toxines sur le cancer experimental. *Acta cancrologica*.
- Roskin, G., Romanova, K.** (1937). Lechenie eksperimental'nogo raka protozooinymi toksinami. *Biulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny*.
- Roskin, G., Romanova, K.** (1938a). Etude de l'action therapeutique des endotoxines des protozoaires sur le cancer experimental. *Biulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny*.
- Roskin, G., Romanova, K.** (1938b). Traitement du cancer experimental par les endotoxines des protozoaires - *Archives Internationales de Médecine Experimentale*.
- Ryo, A., Uemura, H., Ishiguro, H., Saitoh, T., Yamaguchi, A., Perrem, K., ... Aoki, I.** (2005). Stable Suppression of Tumorigenicity by Pin1-Targeted RNA Interference in Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*, 11(20), 7523–7531.
- Sahin, U. et al.** (1995). Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 92, 11810–11813.
- Satelli, A., & Li, S.** (2011). Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(18), 3033–3046.
- Satelli, A., Batth, I., Brownlee, Z., Mitra, A., Zhou, S., Noh, H., ... Li, S.** (2017). EMT circulating tumor cells detected by cell-surface vimentin are associated with prostate cancer progression. *Oncotarget*, 8(30), 49329–49337.

- Satelli, A., Brownlee, Z., Mitra, A., Meng, Q. H., & Li, S.** (2015). Circulating Tumor Cell Enumeration with a Combination of Epithelial Cell Adhesion Molecule- and Cell-Surface Vimentin-Based Methods for Monitoring Breast Cancer Therapeutic Response. *Clinical Chemistry*, 61(1), 259–266.
- Schneider, J., Morr, H., Velcovsky, H.G., Weisse, G., Eigenbrodt, E.** (2000). "Quantitative detection of tumor M2-pyruvate kinase in plasma of patients with lung cancer in comparison to other lung diseases". *Cancer detection and prevention*. 24 (6): 531–5.
- Schneider, J., Schulze, G.** (2003). "Comparison of Tumor M2-pyruvate kinase (Tumor M2-PK), carcinoembryonic antigen (CEA), carbohydrate antigens CA 19-9 and CA 724 in the diagnosis of gastrointestinal cancer". *Anticancer Res.* 23 (6D): 5089–5095.
- Schreiber, RD., Old, LJ., Smyth, MJ.** (2011). Cancer immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science*, 331:1565-1570.
- Sciacovelli, M., Gaude, E., Hilvo, M., & Frezza, C.** (2014). The Metabolic Alterations of Cancer Cells (pp. 1–23).
- Seliger, B., Maeurer, MJ., Ferrone, S.** (2000). Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunology Today*, 21:455–464.
- Shankar, J., Messenberg, A., Chan, J., Underhill, T. M., Foster, L. J., & Nabi, I. R.** (2010). Pseudopodial Actin Dynamics Control Epithelial-Mesenchymal Transition in Metastatic Cancer Cells. *Cancer Research*, 70(9), 3780–3790.
- Shankaran, V. et al.** (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, 410, 1107–1111.
- Škrtić, M., Sriskanthadevan, S., Jhas, B., Gebbia, M., Wang, X., Wang, Z., ... Schimmer, A. D.** (2011). Inhibition of Mitochondrial Translation as a Therapeutic Strategy for Human Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell*, 20(5), 674–688.
- Song, Z., Feng, C., Lu, Y., Lin, Y., & Dong, C.** (2018). PHGDH is an independent prognosis marker and contributes cell proliferation, migration and invasion in human pancreatic cancer. *Gene*, 642, 43–50.
- Spill, F., Reynolds, D.S., Kamm, R.D., Zaman, M.H.** (2016). Impact of the physical microenvironment on tumor progression and metastasis. *Current Opinion in Biotechnology*, 40:41-48.
- Steinmetz, N. F., Maurer, J., Sheng, H., Bensussan, A., Maricic, I., Kumar, V., & Braciak, T. A.** (2011). Two Domains of Vimentin Are Expressed on the Surface of Lymph Node, Bone and Brain Metastatic Prostate Cancer Lines along with the Putative Stem Cell Marker Proteins CD44 and CD133. *Cancers*, 3(3), 2870–2885.
- Strauss, D. C., & Thomas, J. M.** (2010). Transmission of donor melanoma by organ transplantation. *The Lancet Oncology*, 11(8), 790–796.

- Stutman, O.** (1974). Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science*, 183(4124):534-6.
- Stutman, O.** (1975). Delayed tumour appearance and absence of regression in nude mice infected with murine sarcoma virus. *Nature*, 235(5487):142-4.
- Sukari, A., Nagasaka, M., Al-Hadidi, A., Lum, LG.** (2016). Cancer Immunology and Immunotherapy. *Anticancer Res.*, 36:5593-5606.
- Sun, H.-G., Dong, X.-J., Lu, T., Yang, M.-F., & Wang, X.-M.** (2014). Clinical value of eukaryotic elongation factor 2 (eEF2) in non-small cell lung cancer patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 14(11), 6533–6535.
- Tahimic, C. G. T., Tomimatsu, N., Nishigaki, R., Fukuhara, A., Toda, T., Kaibuchi, K., ... Kurimasa, A.** (2006). Evidence for a role of Collapsin response mediator protein-2 in signaling pathways that regulate the proliferation of non-neuronal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340(4), 1244–1250.
- Thomas, L.** (1959). Delayed hypersensitivity in health and disease. In: Lawrence HS, editor. Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States. Hoeber-Harper; New York: pp. 529–532.
- Tomlinson, S., Pontes de Carvalho, L. C., Vandekerckhove, F., & Nussenzweig, V.** (1994). Role of sialic acid in the resistance of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to complement. *Journal of Immunology*, 153(7), 3141–3147.
- Tramontin, G.** (2018). Desarrollo de estrategias de inmunoterapia anti-tumoral utilizando moléculas de *trypanosoma cruzi*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, PEDECIBA.
- Tsui, K.H., Feng, T.H., Lin, Y.F., Chang, P.L., Juang, H.H.** (2011). p53 downregulates the gene expression of mitochondrial aconitase in human prostate carcinoma cells. *The Prostate*. 71(1): 62–70.
- Turnock, D. C., & Ferguson, M. A. J.** (2007). Sugar Nucleotide Pools of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, and *Leishmania major*. *Eukaryotic Cell*, 6(8), 1450–1463.
- 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.** (2016) *Trypanosoma cruzi* extracts elicit protective immune response against chemically induced colon and mammary cancers. *Int J Cancer*, 138(7): 1719-31.

- Ugurel, S., Bell, N., Sucker, A., Zimpfer, A., Rittgen, W., Schadendorf, D.** (2005). "Tumor type M2 pyruvate kinase (TuM2-PK) as a novel plasma tumor marker in melanoma". *Int. J. Cancer*. 117 (5): 825–830.
- 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.
- Ventrucci, M., Cipolla, A., Racchini, C., Casadei, R., Simoni, P., Gullo, L.** (2004). Tumor M2-pyruvate kinase, a new metabolic marker for pancreatic cancer. *Dig. Dis. Sci.* 49 (7–8): 1149–1155.
- Wang, K., Vella, A.T.** (2016). Regulatory T Cells and Cancer: A Two-Sided Story. *Immunol Invest.*, 45:797-812.
- Wang, P., Mai, C., Wei, Y.L., Zhao, J.J., Hu, Y.M., Zeng, Z.L., Yang, J., Lu, W.H., Xu, R.H., Huang, P.** (2013). Decreased expression of the mitochondrial metabolic enzyme aconitase (ACO2) is associated with poor prognosis in gastric cancer. *Medical Oncology*. 30 (2): 552.
- Wang, W., Goswami, S., Lapidus, K., Wells, A. L., Wyckoff, J. B., Sahai, E., ... Condeelis, J. S.** (2004). Identification and Testing of a Gene Expression Signature of Invasive Carcinoma Cells within Primary Mammary Tumors. *Cancer Research*, 64(23), 8585–8594.
- Wang, X., Lin, S., Li, J., Kemmner, W., & Ding, Y.** (2006). [Effect of cell surface sialic acid and their linkages on adhesion of mammary carcinoma cells]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao = Journal of Southern Medical University*, 26(6), 742–746.
- Ward, P. S., & Thompson, C. B.** (2012). Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. *Cancer Cell*, 21(3), 297–308.
- Wechsel, H.W., Petri, E., Bichler, K.H., Feil, G.** (1999). Marker for renal carcinoma (RCC): The dimeric form of pyruvate kinase type M2 (Tu M2-PK). *Anticancer Res.* 19 (4A): 2583–2590.
- Weinberg, R. A.** (2007). *The biology of cancer*. Nueva York,, Garland Science. 1a Edición
- Wild, C.** (2014). Prefacio. In: Stewart BW, Wild C, editors. *World cancer report 2014*. IARC-WHO.
- William, E. P.** (2008). *Fundamental Immunology*. Editorial Lippincott Williams and Wilking. 6ta Ed. capítulo 45: *Tumor immunology*. 1490-1522.
- Wu, S., et al.** (2015) Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. *Nature*, 529(7584):43–47.
- Wu, C.-C., Chen, H.-C., Chen, S.-J., Liu, H.-P., Hsieh, Y.-Y., Yu, C.-J., ... Chang, Y.-S.** (2008). Identification of collapsin response mediator protein-2 as a potential marker of colorectal carcinoma by comparative analysis of cancer cell secretomes. *Proteomics*, 8(2), 316–332.

- Wurz, GT., Kao CJ., DeGregorio, MW.** (2016). Novel cancer antigens for personalized immunotherapies: latest evidence and clinical potential. *Ther Adv Med Oncol.*, 8:4-31.
- Yamaguchi, H., & Condeelis, J.** (2007). Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1773(5), 642–652.
- Yang, Q., Roehrl, M. H., Wang, J. Y., Yang, Q., Roehrl, M. H., Wang, J. Y., ... Wang, J. Y.** (2018). Proteomic profiling of antibody-inducing immunogens in tumor tissue identifies PSMA1, LAP3, ANXA3, and maspin as colon cancer markers. *Oncotarget*, 9(3), 3996–4019.
- Yang, Y.** (2015). Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 125(9), 3335–3337.
- Yang, Z.-L., Miao, X., Xiong, L., Zou, Q., Yuan, Y., Li, J., ... Chen, S.** (2013). CFL1 and Arp3 are Biomarkers for Metastasis and Poor Prognosis of Squamous Cell/Adenosquamous Carcinomas and Adenocarcinomas of Gallbladder. *Cancer Investigation*, 31(2), 132–139.
- Yin, X., Zhang, Y., Guo, S., Jin, H., Wang, W., & Yang, P.** (2015). Large scale systematic proteomic quantification from non-metastatic to metastatic colorectal cancer. *Scientific Reports*, 5(1), 12120.
- Yu, L.** (2007). The oncofetal Thomsen-Friedenreich carbohydrate antigen in cancer progression. *Glycoconjugate Journal*, 24: 411-420.
- Zamay, T. N., Zamay, G. S., Kolovskaya, O. S., Zukov, R. A., Petrova, M. M., Gargaun, A., ... Kichkailo, A. S.** (2017). Current and Prospective Protein Biomarkers of Lung Cancer. *Cancers*, 9(11).
- Zardavas, D., Tryfonidis, K., Goulioti, T., Piccart, M.** (2016). Targeted adjuvant therapy in breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.*, 16: 1263-1275.
- Zenina, A., Kravtsov, E., Tsetsegsaikhan, B., et al.** (2008). The study of immunological component in antitumor effect of *Trypanosoma cruzi*. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 145(3), 352–354.
- Zhang, B., Chen, J.Y., Chen, D.D., Wang, G.B., Shen, P.** (2004). Tumor type M2 pyruvate kinase expression in gastric cancer, colorectal cancer and controls. *World J. Gastroenterol.* 10(11): 1643–1646.
- Zhang, X., Hu, L., Du, M., Wei, X., Zhang, J., Hui, Y., ... Hou, J.** (2017). Eukaryotic Elongation Factor 2 (eEF2) is a Potential Biomarker of Prostate Cancer. *Pathology & Oncology Research*. [Epub ahead of print].
- Zheng, H.-C., Zheng, Y.-S., Li, X.-H., Takahashi, H., Hara, T., Masuda, S., ... Takano, Y.** (2008). Arp2/3 overexpression contributed to pathogenesis, growth and invasion of gastric carcinoma. *Anticancer Research*, 28(4B), 2225–2232.

Zhou, X. Z., & Lu, K. P. (2016). The isomerase PIN1 controls numerous cancer-driving pathways and is a unique drug target. *Nature Reviews Cancer*, 16(7), 463–478.