



TESIS DE MAESTRÍA

DESARROLLO DE ESTRATEGIAS DE INMUNOTERAPIA ANTI-TUMORAL UTILIZANDO MOLÉCULAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS – PEDECIBA
OPCIÓN BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

ORIENTADOR: DR. EDUARDO OSINAGA

CO-ORIENTADORA: DRA. MARÍA GABRIELA KRAMER

TRIBUNAL

PRESIDENTE: DR. CARLOS CARMONA

VOCALES: DRES. ALFONSO CAYOTA Y DANIEL ALONSO

GUILLERMO TRAMONTIN

LABORATORIO DE GLICOBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA TUMORAL
Institut Pasteur de Montevideo

Índice

RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 Biología del cáncer	6
1.2 Metástasis – Los verdaderos enemigos	10
1.3 Inmunovigilancia del cáncer – Entendiendo el rol del sistema inmune	12
1.4 Inmunoección del cáncer – Avances en la comprensión de la complejidad de la inmunología tumoral	14
1.5 Inflamación y cáncer – El rol dual de los procesos inflamatorios	19
1.6 Neo-antígenos – Blancos interesantes para el desarrollo de nuevos tratamientos anti-tumorales	20
1.7 Inmunoterapia del cáncer – Un punto de inflexión en la historia de los tratamientos anti-tumorales	21
1.8 <i>Trypanosoma cruzi</i> – Similitudes biológicas y antigénicas con células tumorales	24
1.9 ¿Podría el <i>Trypanosoma cruzi</i> ser utilizado en la inmunoterapia anti-tumoral?	27
2. OBJETIVO GENERAL	32
2.1 Objetivos específicos	32
3. MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1 Cultivo de parásitos	33
3.2 Lisis celular de <i>T. cruzi</i> y extracción de proteínas	33
3.3 Cuantificación de proteínas	34
3.4 Generación de suero de conejo anti- <i>T. cruzi</i>	34
3.5 Líneas celulares	34

3.6 Extracción de proteínas.....	35
3.7 Ensayo de viabilidad celular	35
3.8 Electroforesis en gel de poliacrilamida	36
3.9 <i>Western blot</i>	36
3.10 Preparación de láminas de células para ensayos de Inmunofluorescencia Indirecta	37
3.11 Evaluación de la reactividad del suero anti- <i>T. cruzi</i> sobre células tumorales 4T1 mediante Inmunofluorescencia Indirecta	37
3.12 Desarrollo del modelo animal.....	38
3.13 Evaluación de la reactividad de sueros anti- <i>T. cruzi</i> sobre células tumorales 4T1 mediante ensayos de tipo ELISA.....	40
3.14 Evaluación de la reactividad del suero anti- <i>T. cruzi</i> sobre células tumorales 4T1 mediante citometría de flujo.....	41
3.15 Evaluación de la reactividad del suero de conejo anti- <i>T. cruzi</i> sobre tumores y metástasis pulmonares 4T1 mediante Inmunohistoquímica	42
3.16 Ensayo clonogénico y conteo de células metastásicas.....	43
3.17 Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad citotóxica de esplenocitos activados por el extracto de <i>T. cruzi</i>	43
3.18 Evaluación de la reactividad del suero de conejo anti- <i>T. cruzi</i> sobre muestras de tumores humanos mediante IHQ	45
3.19 Extracción de ARN a partir de ganglios de ratones	45
3.20 Ensayos de expresión génica por qRT-PCR	46
3.21 Análisis estadísticos.....	47
4. RESULTADOS	48
4.1 Generación del extracto de <i>T. cruzi</i>	48

4.2 Evaluación <i>in vitro</i> de la capacidad citotóxica del extracto de <i>T. cruzi</i> sobre células tumorales 4T1	48
4.3 Evaluación <i>in vivo</i> del potencial terapéutico del extracto de <i>T. cruzi</i> sobre tumores 4T1	50
4.4 Evaluación <i>in vitro</i> del reconocimiento de antígenos tumorales por parte de un suero de conejo anti- <i>T. cruzi</i>	53
4.4.1 Evaluación del reconocimiento por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).....	53
4.4.2 Evaluación del reconocimiento por Citometría de Flujo	54
4.4.3 Evaluación del reconocimiento por <i>Western blot</i>	56
4.4.4 Evaluación del reconocimiento por Inmunohistoquímica (IHQ)	57
4.5 Evaluación <i>in vitro</i> de la capacidad citotóxica de esplenocitos murinos sobre células tumorales	61
4.6 Evaluación del reconocimiento de antígenos tumorales por parte de sueros de ratón anti- <i>T. cruzi</i>	62
4.7 Ensayo clonogénico.....	64
4.8 Evaluación <i>in vivo</i> de la expresión de genes asociados a un fenotipo supresor a nivel de ganglio linfático drenante de tumor	66
4.9 Evaluación del reconocimiento de antígenos tumorales por parte del suero de conejo anti- <i>T. cruzi</i> en un panel de tejidos mamarios normales y malignos humanos.....	67
4.10 Evaluación de otros tipos de tumores humanos	69
4.11 Evaluación en cáncer colorrectal humano.....	74
5. DISCUSIÓN	77
5.1 Evaluación del potencial terapéutico de un extracto de <i>Trypanosoma cruzi</i> en un modelo animal de cáncer de mama metastásico.	80

5.2 Estudio de la presencia de antígenos de reacción cruzada entre <i>Trypanosoma cruzi</i> y células tumorales por abordajes técnicos complementarios.	85
5.3 Caracterización de la respuesta inmune anti-tumoral observada y evaluación de aspectos propios del modelo animal.....	91
5.4 Análisis del reconocimiento antigénico por parte de un suero de conejo anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> sobre muestras humanas de diferentes tumores y tejidos normales.....	94
6. CONCLUSIONES	97
7. PERSPECTIVAS	98
8. BIBLIOGRAFÍA	100

RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. La mayoría de las muertes por cáncer se atribuyen a la diseminación metastásica de las células tumorales a órganos vitales, por lo que la búsqueda de un tratamiento efectivo de las metástasis constituye un objetivo central de la investigación en terapias anti-tumorales.

Las estrategias de inmunoterapia anti-tumoral buscan potenciar la actividad del sistema inmune del paciente de manera de poder erradicar los tumores. Entre ellas, una que se destaca por su originalidad es el uso del *Trypanosoma cruzi* y sus componentes como estrategia de inmunoterapia anti-tumoral.

Estudios previos de nuestro laboratorio apoyan la hipótesis de que existirían ciertos epítomos compartidos entre el parásito y las células tumorales. A su vez, hemos logrado demostrar que existe actividad anti-tumoral por parte de lisados de la forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*, en modelos de rata y ratón, tanto en abordajes profilácticos como terapéuticos.

Para nuestro modelo de trabajo con la línea celular tumoral 4T1 se corroboró que el extracto de *T. cruzi* no ejerce un efecto citotóxico directo sobre las células tumorales. También se confirmó el potencial terapéutico de vacunas formuladas a partir de dicho extracto en un modelo animal de relevancia clínica. Además, se evidenció la presencia de antígenos de reacción cruzada entre *T. cruzi* y células tumorales de la línea 4T1. De manera interesante, la vacunación con extractos de *T. cruzi* disminuyó la cantidad de células tumorales metastásicas a nivel pulmonar y aumentó la capacidad citotóxica anti-tumoral de esplenocitos de animales inmunizados. Finalmente, y luego del análisis de más de 700 muestras de tejidos humanos tumorales y no tumorales, se reafirmó que anticuerpos anti-*T. cruzi* reconocen preferentemente tejidos tumorales con variada intensidad pero con un mismo patrón de inmunomarcado.

Los resultados obtenidos en este trabajo abren nuevos horizontes para el desarrollo de vacunas formuladas a partir de componentes parasitarios que logren potenciar la actividad del sistema inmune y así ayudar a eliminar las células tumorales.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Biología del cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del cuerpo y que se caracteriza por un desbalance entre la proliferación y la muerte celular. En esta enfermedad, se produce un crecimiento descontrolado de células anormales que, a medida que van sufriendo alteraciones genéticas y acumulando mutaciones, generan la aparición de un nuevo fenotipo transformado. Estas células adquieren en última instancia la capacidad de migrar e invadir otros tejidos, desencadenando así el proceso conocido como metástasis.

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, con aproximadamente 14 millones de nuevos casos en 2012 y 8.8 millones de muertes en 2015. Se espera que el número de nuevos casos aumente en un 70% en las próximas dos décadas (Ferlay *et al*, 2015). La mayoría de las muertes por cáncer se atribuyen a la diseminación metastásica de las células tumorales a órganos vitales, en lugar de al crecimiento del tumor primario.

En el año 2000, Hanahan & Weinberg definieron seis capacidades distintivas y complementarias que permiten el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica, a las cuales definieron como *hallmarks* del cáncer. En una revisión actualizada en 2011 agregaron otras cuatro, de manera de continuar proporcionando una base sólida para la comprensión de la biología tumoral (Figura 1, Hanahan & Weinberg, 2011).

Los tejidos normales controlan cuidadosamente la producción y secreción de señales promotoras del crecimiento y la proliferación celular, las cuales instruyen a las células durante la entrada y la progresión a través del ciclo celular, de manera de mantener un determinado nivel de homeostasis celular. Las células tumorales, al desregular estas señales, pierden ese control sobre la proliferación celular. Los posibles mecanismos por los cuales las células tumorales lograrían

romper la homeostasis van desde la propia producción de factores de crecimiento, a los cuales responden a través de la expresión de receptores de membrana; la estimulación de las células normales del estroma asociado al tumor, las cuales suplementarían a las células tumorales con factores de crecimiento; la desregulación de la señalización por causa de un aumento en los niveles de expresión de receptores en la superficie celular, otorgándole a la célula transformada una mayor capacidad de respuesta a ligandos y una posible aparición de alteraciones estructurales en las moléculas de receptores que faciliten la activación independiente de ligando (Hanahan & Weinberg, 2011).

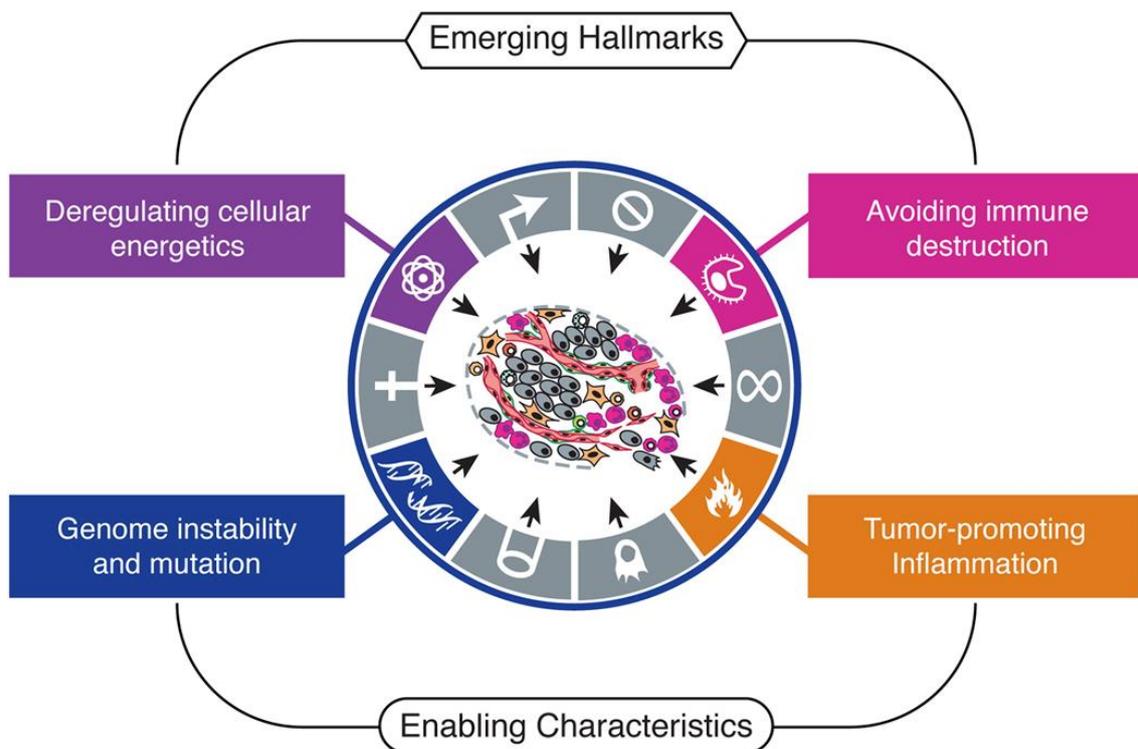


Figura 1. Hallmarks del cáncer. Se observan las seis características que permiten el crecimiento y la diseminación de células tumorales originalmente descritas por Hanahan & Weinberg: Mantenimiento de señales de proliferación, Evasión de supresores del crecimiento, Capacidad invasiva, Inmortalidad replicativa, Inducción de angiogénesis y Resistencia a la muerte celular. Además se agregan dos nuevos hallmarks: Desregulación del metabolismo celular y Evitación de la destrucción por parte del sistema inmune. La adquisición de estos hallmarks del cáncer es posible gracias a dos características subyacentes: Desarrollo de la inestabilidad genómica e Inflamación pro-tumoral. Tomado de Hanahan & Weinberg, 2011.

De manera interesante, las alteraciones que determinen una activación constitutiva también pueden darse en componentes de vías de señalización que estén operando corriente abajo de los receptores de membrana, obviando la necesidad de una activación de receptores mediada por ligandos.

Adicionalmente, las células cancerosas deben ser capaces de eludir los poderosos programas que regulan negativamente la proliferación celular. Muchos de estos programas dependen de proteínas codificadas por genes supresores de tumores (Hanahan & Weinberg, 2011).

Otras características a destacar incluyen la resistencia a la muerte celular, la inmortalidad replicativa, la inducción del proceso de angiogénesis y la capacidad de invadir otros tejidos para originar metástasis.

La muerte celular programada por apoptosis sirve como una barrera natural al desarrollo del cáncer. La apoptosis se desencadena en respuesta al estrés fisiológico que experimentan las células cancerosas a medida que atraviesan el proceso de tumorigenesis, o en respuesta a las terapias anti-tumorales. Este proceso puede darse ya sea por una vía intrínseca (también conocida como vía mitocondrial) o por una vía extrínseca, ambas independientes entre sí. La maquinaria apoptótica se compone de reguladores, localizados corriente arriba y de componentes efectores, ubicados corriente abajo, todo lo cual determina la activación de cisteín-proteasas intracelulares denominadas caspasas que provocarán la destrucción celular como consecuencia del clivado de varios cientos de proteínas celulares (Adams & Cory, 2007).

Las células tumorales requieren de un potencial replicativo ilimitado de manera de generar tumores macroscópicos. Esta visión se contrapone con lo conocido para células normales, las cuales pueden atravesar solamente un número limitado de ciclos sucesivos de crecimiento y división celular. Esta limitación está asociada a dos procesos que actúan como barreras a la proliferación: la senescencia, definida como la entrada a un estado estable pero no proliferativo,

y la crisis, asociada a muerte celular. Uno de los mecanismos por los cuales las células tumorales evadirían estos procesos reside en los telómeros que protegen los extremos de los cromosomas (Blasco, 2005).

Al igual que los tejidos normales, los tumores requieren sustento en forma de nutrientes y de oxígeno, y precisan poder eliminar los desechos metabólicos y el dióxido de carbono. Para ello, cuentan con la neo-vasculatura asociada al tumor generada por el proceso de angiogénesis. Durante la progresión tumoral se activa un *switch* angiogénico, que permanece encendido, causando que de la vasculatura normal quiescente continúen brotando nuevos vasos que ayudan a mantener el crecimiento neoplásico (Hanahan & Folkman, 1996).

La adquisición de estos *hallmarks* del cáncer es posible gracias a dos características subyacentes: el desarrollo de la inestabilidad genómica en las células cancerosas, que genera mutaciones aleatorias, incluyendo a los arreglos cromosómicos; y el estado inflamatorio de lesiones pre-malignas y malignas, impulsado por las células del sistema inmune, algunas de las cuales sirven para promover la progresión tumoral por diversos medios (Hanahan & Weinberg, 2011).

Dos *hallmarks* emergentes que los autores consideran importante agregar en su revisión del año 2011 son la reprogramación del metabolismo energético celular para apoyar el crecimiento y la proliferación celular continua, reemplazando así el programa metabólico que opera en la mayoría de los tejidos normales; y la evasión activa por parte de las células cancerosas del ataque y la eliminación por las células inmunes. Esta capacidad resalta las funciones dicotómicas de un sistema inmunitario que tanto antagoniza como mejora el desarrollo y la progresión del tumor (Hanahan & Weinberg, 2011).

La adquisición de estos rasgos distintivos está íntimamente relacionada con el microambiente tumoral, es decir, el ambiente celular en el que el tumor existe.

La consideración de dicho microambiente suma a la complejidad de la progresión tumoral (Figura 2).

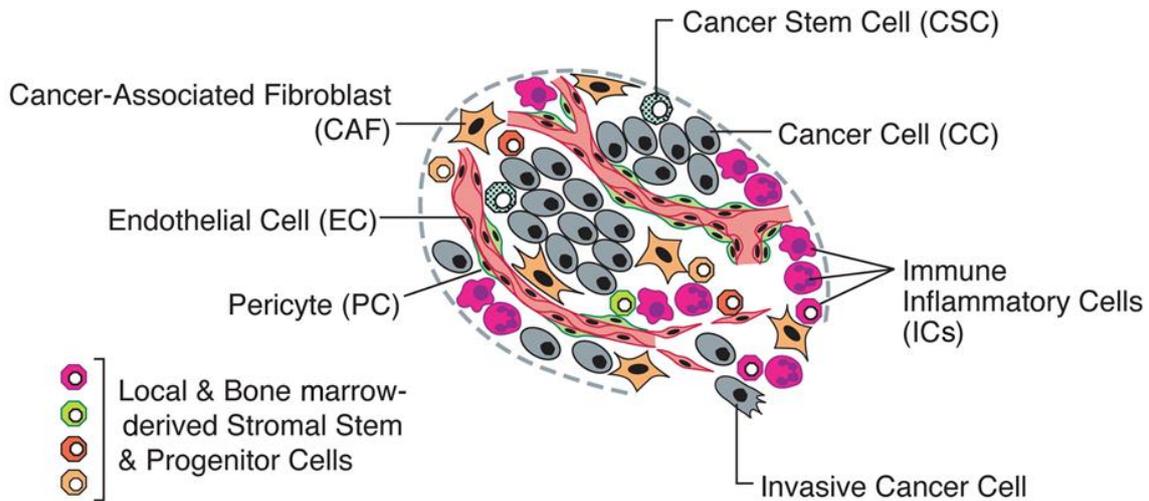


Figura 2. Las células del microambiente tumoral. Los tumores sólidos están constituidos por un conjunto de distintos tipos de células que, colectivamente, permiten el crecimiento y la progresión del tumor. Entre las poblaciones más relevantes se encuentran: las propias células tumorales, células madre tumorales, fibroblastos asociados a cáncer, células endoteliales, pericitos y células inflamatorias. En particular, las células inmunes presentes en los tumores pueden incluir tanto subclases promotoras de tumores como supresoras de tumores. Tomado de Hanahan & Weinberg, 2011.

1.2 Metástasis – Los verdaderos enemigos

La metástasis tumoral es un proceso de múltiples etapas durante el cual las células malignas se diseminan desde el tumor primario a órganos no contiguos. Este proceso depende tanto de las características intrínsecas de las células tumorales, como de la respuesta del hospedero. En 1889, el cirujano inglés Stephen Paget sugirió que los órganos distantes no podían ser totalmente pasivos o indiferentes con respecto a la detención de émbolos de células tumorales en su vasculatura, y propuso el principio de la semilla y el suelo, haciendo referencia a que cuando una planta va a diseminar sus semillas, lo hace en múltiples direcciones, sin embargo, esas semillas deben caer en un suelo adecuado para su germinación. De igual manera, las células tumorales se diseminan a través de la

vasculatura hacia todo el cuerpo, pero solamente se alojarán en un nicho que les sea adecuado (Paget, 1889).

Esta sucesión de cambios biológicos celulares comienza con una invasión local, seguida de la intravasación por células cancerosas hacia vasos sanguíneos y linfáticos cercanos, el tránsito de dichas células a través de los sistemas linfático y sanguíneo, seguido por la salida de tales células de la luz de los vasos hacia el parénquima de los tejidos distantes (fenómeno conocido como extravasación), la formación de pequeños nódulos de células cancerosas (micro-metástasis), y finalmente, el crecimiento de lesiones micro-metastásicas en tumores macroscópicos (colonización) (Talmadge & Fidler, 2010; Hanahan & Weinberg, 2011).

Un programa regulatorio del desarrollo, conocido como transición epitelio-mesenquimal (*Epithelial-Mesenchymal Transition*, EMT por sus siglas en inglés), se ha convertido en un factor importante por el cual las células epiteliales transformadas pueden adquirir la capacidad de invadir nuevos tejidos, resistir la apoptosis y diseminarse (Klymkowsky & Savagner, 2009).

Durante este proceso, las células epiteliales pierden su polaridad apico-basal, pierden contactos extensivos célula-célula y pierden la expresión de marcadores epiteliales característicos, mientras que adquieren la expresión de proteínas mesenquimales, aumentan la motilidad celular y la capacidad de invadir tejidos.

A su vez, se ha demostrado que las células tumorales de origen epitelial pueden pasar a un fenotipo mesenquimatoso distinto o, como se observa con mayor frecuencia, adquirir características mesenquimatosas al tiempo que conservan ciertos rasgos epiteliales. Este fenotipo tumoral “híbrido” o “intermedio” ha sido validado, por ejemplo, en un estudio con células tumorales circulantes (CTCs) de pacientes con cáncer de mama metastásico, donde las CTCs exhibieron un fenotipo epitelial o mesenquimal definido, pero también mostraron diversos

niveles de co-expresión de marcadores epiteliales y mesenquimatosos (Yu *et al*, 2013).

Los factores de transcripción asociados a la EMT como ser Snail, Slug, Twist y Brachyury, se han correlacionado positivamente, tanto en tumores primarios y en CTCs, con un estadio tumoral avanzado (Cheng *et al*, 2007; Hotz *et al*, 2007; Jin *et al*, 2010), la presencia de metástasis (Zhao *et al*, 2015), y el mal pronóstico en numerosos tipos de cáncer (Spaderna *et al*, 2006; Roselli *et al*, 2012; Palena *et al*, 2014). La asociación de la EMT con un mal resultado clínico también respalda el concepto de que la adquisición de características mesenquimatosas hace que las células tumorales sean resistentes al efecto citotóxico de terapias anti-tumorales, incluyendo quimioterapia (Lim *et al*, 2013; Deng *et al*, 2016), radioterapia (Kurrey *et al*, 2009), terapias dirigidas (Arumugam *et al*, 2009; Suda *et al*, 2011), y lisis por células efectoras del sistema inmune (Kudo-Saito *et al*, 2009; Hamilton *et al*, 2014).

1.3 Inmunovigilancia del cáncer – Entendiendo el rol del sistema inmune

A comienzos del siglo XX, Paul Ehrlich sugirió que, gracias a la acción del sistema inmune, el desarrollo de los tumores se encontraría generalmente suprimido, y que, de no ser por esto, el desarrollo de tumores sería frecuente en animales de larga vida (Ehrlich, 1909). Más adelante en el tiempo, sobre finales de 1950, y con un mejor entendimiento de la inmunobiología e inmunogenética, Frank MacFarlane Burnet y Lewis Thomas formularon la teoría de la inmunovigilancia del cáncer (Burnet, 1957; Thomas, 1959). Según ellos, la inmunidad adaptativa era la responsable de prevenir el desarrollo del cáncer en individuos inmunocompetentes. Sin embargo, los estudios posteriores de Osias Stutman (Stutman, 1974; Stutman, 1975) proporcionaron poco apoyo para esta teoría y fue así que la misma fue abandonada.

Ya en la década de 1990, experimentos en animales inmunodeficientes permitieron a algunos grupos volver a evaluar el papel de la inmunidad en el control del cáncer. El interés en la vigilancia inmunológica del cáncer se reavivó con el descubrimiento de la importancia del interferón-gamma (IFN- γ) en la promoción del rechazo inmunológico de células tumorales trasplantadas (Dighe *et al*, 1994) y la demostración de que animales carentes de respuestas al IFN- γ (Ifn γ ^{-/-} o Stat1^{-/-}) o sin inmunidad adaptativa (Rag2^{-/-}), eran más susceptibles a la formación de tumores primarios espontáneos e inducidos por carcinógenos químicos (Kaplan *et al*, 1998; Shankaran *et al*, 2001). Fue así que estos hallazgos documentaron que el sistema inmune puede funcionar como un supresor tumoral extrínseco (Figura 3).

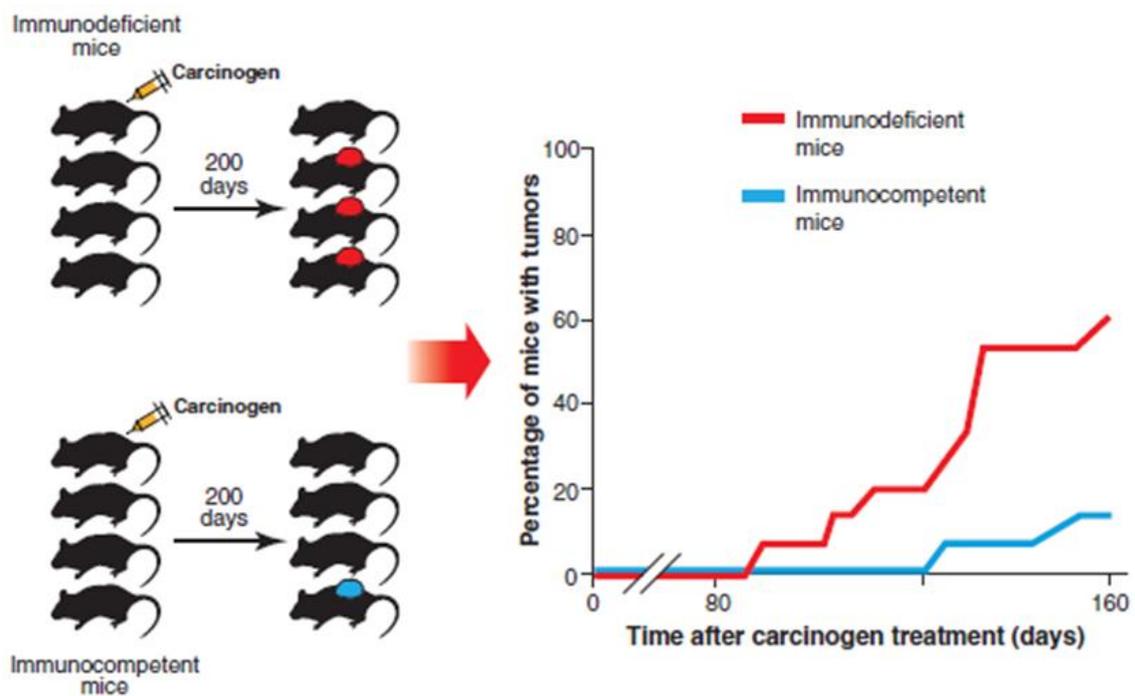


Figura 3. La inmunidad de los individuos como determinante crítico de la susceptibilidad al cáncer. Se observa un esquema de uno de los experimentos pioneros que permitió probar que los ratones inmunodeficientes son más propensos al desarrollo de tumores que los ratones inmunocompetentes, luego del tratamiento con carcinógenos químicos, poniendo así en evidencia el rol de la inmunidad en la supresión y promoción del cáncer. Tomado de Shreiber *et al*, 2011.

Hoy en día se acepta que no es sólo tarea de la inmunidad adaptativa el prevenir la aparición de tumores, sino que también el sistema inmune innato juega un rol

significativo en el reconocimiento y la eliminación de células tumorales. Las células de la inmunidad innata, y en particular las células NK, expresan un set fijo de receptores de membrana codificados en línea germinal, los cuales se unen a ligandos específicos del tumor para llevar a cabo funciones supresoras (Iannello *et al*, 2016).

NKG2D es un receptor activador expresado en células NK, ciertos linfocitos T CD8+, linfocitos T $\gamma\delta$, células NKT y ciertos linfocitos T CD4+. La unión con sus ligandos estimula la producción de citoquinas y el poder citotóxico de la célula NK. Dicho receptor reconoce, en humanos, dos subfamilias de ligandos, relacionados a la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC): MICA-B y ULBP1-6. Estos ligandos son pobremente expresados por las células normales, pero su expresión se ve inducida en células infectadas por virus y en células tumorales, como resultado de la activación de varias vías asociadas al estrés celular (Raulet *et al*, 2013).

1.4 Inmunoedición del cáncer – Avances en la comprensión de la complejidad de la inmunología tumoral

El descubrimiento en 2001 de que el sistema inmune controla no solo la cantidad de células tumorales, sino también la inmunogenicidad del tumor, provocó una revisión importante de la hipótesis de la inmunovigilancia del cáncer (Shankaran *et al*, 2001; Dunn *et al*, 2004).

Este estudio reveló que aquellos tumores que aparecían en ratones carentes de un sistema inmune intacto eran, como grupo, más inmunogénicos que tumores similares derivados de ratones inmunocompetentes. A los tumores del primer grupo se los denominó “no editados” mientras que los formados en ratones inmunocompetentes se denominaron “editados”. La noción de que el sistema inmune no solo protege al huésped contra la formación de tumores, sino que

también moldea la inmunogenicidad tumoral es la base de la hipótesis de la inmunoedición del cáncer, que propone una acción doble de la inmunidad en el desarrollo de tumores: por un lado, una acción protectora del huésped y por el otro, una acción formadora de tumores.

Robert Schreiber y colaboradores propusieron en 2011 que el proceso de inmunoedición del cáncer, en su realización más compleja, avanza secuencialmente a través de tres fases distintas que denominaron eliminación, equilibrio y escape (Figura 4).

La fase de eliminación se puede entender como una versión actualizada del concepto de inmunovigilancia contra el cáncer, en la cual los sistemas inmune innato y adaptativo trabajan en conjunto para detectar la presencia de un tumor en desarrollo y destruirlo antes de que se vuelva clínicamente aparente. Los mecanismos por los cuales se alerta al sistema inmune de la presencia de un tumor en desarrollo no se conocen por completo. Entre las posibilidades se encuentran las señales de peligro clásicas, como los IFNs de tipo I, originalmente descritos por Matzinger en 1994, cuya expresión es inducida tempranamente durante el desarrollo del tumor. Estas citoquinas activan las células dendríticas (*Dendritic Cells*, DCs por sus siglas en inglés) y promueven la inducción de respuestas inmunes adaptativas anti-tumorales. Sin embargo, también se deben tener en cuenta las funciones de diferentes moléculas de patrones moleculares asociadas al daño (*Damage-associated Molecular Patterns*, DAMPs por sus siglas en inglés), ya que se liberan directamente de células tumorales moribundas o de tejidos dañados a medida que los tumores sólidos comienzan a crecer de forma invasiva (Sims *et al*, 2010). Un tercer mecanismo potencial puede implicar ligandos de estrés como RAE-1 y H60 (ratón) o MICA/B (humano) que se expresan con frecuencia en la superficie de las células tumorales. Tales ligandos se unen a los receptores de activación en las células de la inmunidad innata, lo que lleva a la liberación de citoquinas proinflamatorias e inmunomoduladoras, que a su vez establecen un microambiente que facilita el desarrollo de una respuesta inmune

adaptativa específica de tumor (Guerra *et al*, 2008). Si la destrucción de las células tumorales llega a completarse, la fase de eliminación representa el punto final del proceso de inmunoedición del cáncer.

Si el sistema inmune no puede eliminar todo el tumor, las células supervivientes pueden entrar en la fase de equilibrio donde su expansión global está restringida inmunológicamente pero donde no ocurre destrucción neta de células tumorales. Es en esta fase en donde se esculpe la inmunogenicidad de dichas células. Si la edición lleva a una alteración tal que ya no permite que las células tumorales puedan ser identificadas como extrañas por el sistema inmune del huésped, comienzan a crecer progresivamente, establecen un microambiente tumoral inmunosupresor y emergen como la enfermedad clínicamente aparente que conocemos como cáncer. Esta fase tal vez sea la fase más larga del proceso de inmunoedición del cáncer, pudiéndose extender todo a lo largo de la vida del huésped y como tal, puede representar un segundo punto final del proceso de inmunoedición del cáncer. Una diferencia a destacar entre las fases de eliminación y equilibrio es que la primera requiere de la acción tanto del sistema inmune innato como el adaptativo, mientras que en la segunda, es el sistema inmune adaptativo el principal encargado de mantener las células tumorales ocultas, específicamente la acción de la interleuquina 12 (IL-12), IFN- γ y células T CD4⁺ y CD8⁺ (Koebel *et al*, 2007).

En la fase de escape, las células tumorales que han adquirido la capacidad de eludir el reconocimiento y/o la destrucción por parte del sistema inmune emergen como tumores visibles de crecimiento progresivo. La progresión desde el equilibrio a la fase de escape puede ocurrir porque la población de células tumorales cambia en respuesta a las funciones de edición del sistema inmune y/o porque el sistema inmune del huésped cambia o se deteriora en respuesta a una mayor inmunosupresión inducida por el propio tumor.

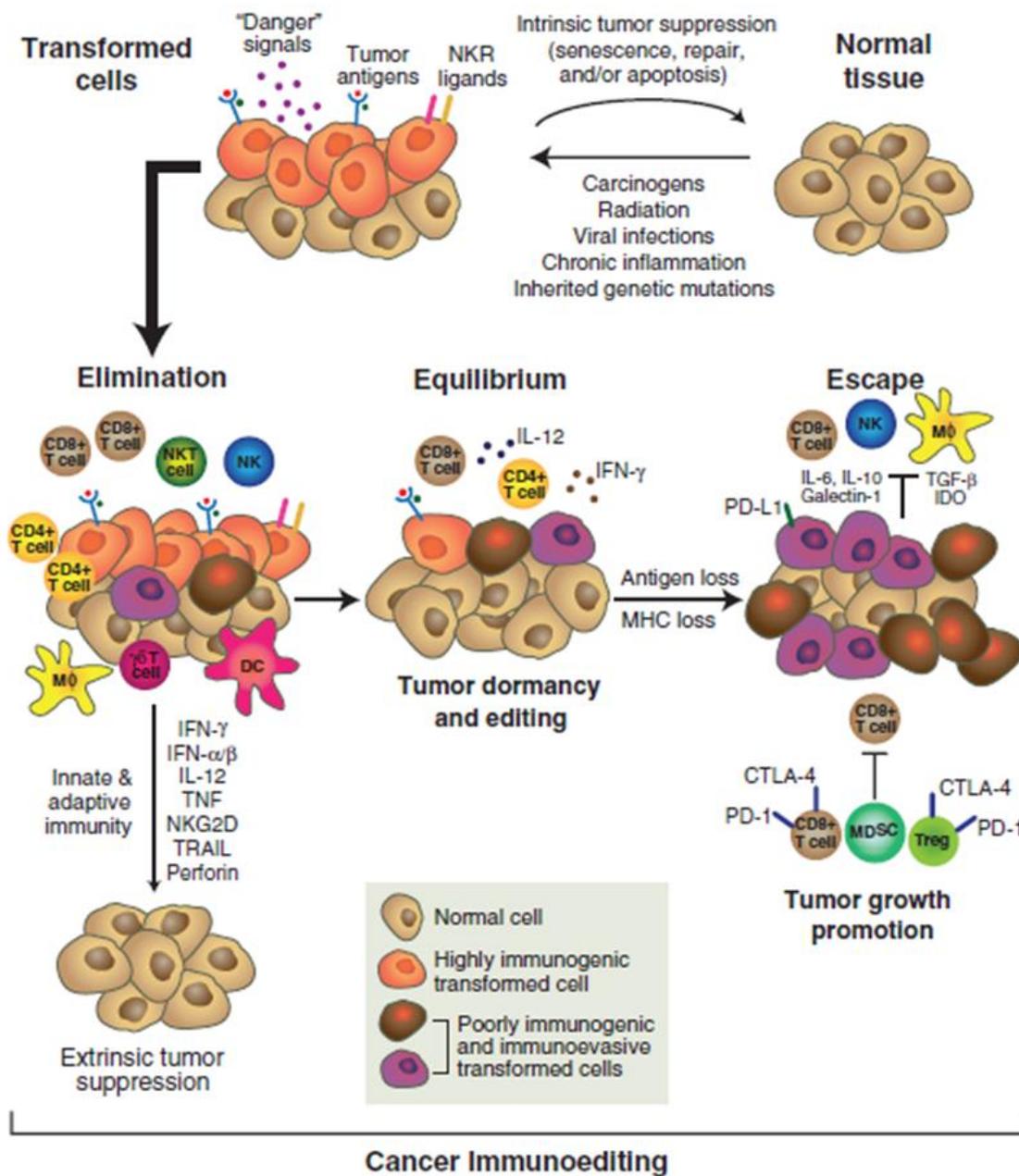


Figura 4. La immunoedición del cáncer. La immunoedición del cáncer consiste en tres fases secuenciales: eliminación, equilibrio y escape. En la fase de eliminación, la inmunidad innata y adaptativa trabajan en conjunto para destruir los tumores en desarrollo. Durante la fase de equilibrio, el crecimiento tumoral se previene mediante mecanismos inmunológicos y se edita la inmunogenicidad del tumor. Finalmente, las células tumorales pueden entrar en la fase de escape, en la que su crecimiento ya no está bloqueado por el sistema inmune. Estas células tumorales emergen para causar una enfermedad clínicamente aparente. Tomado de Shreiber *et al*, 2011.

Los mecanismos por los cuales se puede dar el escape de manera que se promueva el crecimiento tumoral son varios e incluyen, a nivel de la célula tumoral, una reducción en el reconocimiento por parte del sistema inmune y un

aumento en la resistencia a los efectos citotóxicos de la inmunidad. El primer punto se relaciona a una pérdida en la expresión de antígenos tumorales, lo cual puede ocurrir de al menos tres formas: aparición de células tumorales que carecen de la expresión de antígenos inmunodominantes asociados al rechazo tumoral, pérdida de expresión de moléculas de MHC-I que presenten dichos antígenos a las células T específicas y pérdida de función del procesamiento antigénico, necesario para la producción de epítopos peptídicos antigénicos.

Todas estas alteraciones son probablemente impulsadas por una combinación de inestabilidad genética inherente a todas las células tumorales y por el propio proceso de inmunoselección. El resultado final es la generación a través de un proceso de selección darwiniano de variantes de células tumorales poco inmunogénicas que se vuelven "invisibles" al el sistema inmune y así adquieren la capacidad de crecer progresivamente.

Alternativa y complementariamente, el escape puede resultar del establecimiento de un estado inmunosupresor dentro del microambiente tumoral. Las células tumorales pueden promover el desarrollo de dicho estado al producir citoquinas inmunosupresoras como ser el factor de crecimiento vascular endotelial (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF por sus siglas en inglés), factor de crecimiento transformante- β (*Transforming Growth Factor- β* , TGF- β por sus siglas en inglés), galectina y/o indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO). A su vez pueden reclutar células inmunes pro-tumorales con función reguladora como ser linfocitos T reguladores (T_{regs}), células supresoras de origen mieloide (*Myeloid-Derived Suppressor Cells*, MDSCs por sus siglas en inglés), células dendríticas asociadas a tumores (*Tumor-Associated Dendritic Cells*, TADCs por sus siglas en inglés), macrófagos asociados a tumor (*Tumor-Associated Macrophages*, TAMs por sus siglas en inglés), y los linfocitos Th17, entre otros, todos las cuales juegan un rol clave en la inhibición de las respuestas anti-tumorales del huésped. Además, las células T expresan receptores inhibitorios de puntos de control, tales como la molécula de muerte celular programada-1 (*Programmed Cell Death*

Protein-1, PD-1 por sus siglas en inglés) y la proteína asociada a linfocitos T citotóxicos-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein-4*, CTLA-4 por sus siglas en inglés), que se activan por ligandos expresados en células inmunes pro-tumorales y por las propias células tumorales. En conjunto, estos mecanismos inmunosupresores neutralizan sinérgicamente la inmunidad antitumoral y aceleran la progresión del tumor.

1.5 Inflamación y cáncer – El rol dual de los procesos inflamatorios

La inflamación es un proceso fisiológico complejo que normalmente funciona para mantener la homeostasis del tejido en respuesta a factores estresantes, como ser la infección o el daño tisular. Ya en el año 1863, Rudolf Ludwig Carl Virchow identificó lo que fue la primera correlación entre inflamación y cáncer, al observar la presencia de leucocitos en tejidos tumorales (Balkwill *et al*, 2001). La inflamación aguda, a cargo de la inmunidad innata, frecuentemente precede al desarrollo de respuestas inmunes adaptativas protectoras a patógenos y al cáncer. Sin embargo, si la inflamación no está regulada, puede volverse crónica, induciendo el crecimiento maligno en el tejido circundante, debido a la producción persistente de factores de crecimiento así como de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (NOS) que interactúan con el ADN del epitelio en proliferación y resultan en alteraciones genómicas permanentes. Es así que la inflamación crónica ha demostrado contribuir a la tumorigénesis en todas sus etapas: contribuye al inicio del cáncer al generar estrés genotóxico, a la promoción del cáncer al inducir la proliferación celular y a la progresión del cáncer al mejorar la angiogénesis y la invasión tisular (Grivennikov *et al*, 2010).

Diferentes mediadores inflamatorios pueden estimular el desarrollo de tumores, incluyendo citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, radicales libres, prostaglandinas y enzimas proteolíticas. Estos factores son producidos por una

variedad de células que pueblan el microambiente tumoral, como macrófagos, neutrófilos, linfocitos, DCs, células NK, fibroblastos, adipocitos y células endoteliales, y en ocasiones también por las propias células tumorales. Algunos de estos factores actúan directamente sobre las células cancerígenas, estimulando su proliferación e inhibiendo su muerte mientras promueven la acumulación de mutaciones oncogénicas, mientras que otros factores manifiestan su actividad tumorigénica al actuar sobre otros componentes del microambiente tumoral. Es por esto que hoy en día existen varios abordajes que tienen como blanco terapéutico el microambiente inflamatorio.

En relación al proceso de inmunoección del cáncer, durante la fase de eliminación, las células NK y los macrófagos activados producen IFN- γ e IL-12, que eliminan las células tumorales al iniciar respuestas citotóxicas, gracias a la producción de moléculas como perforina, factor de necrosis tumoral- α (*Tumor Necrosis Factor- α* , TNF- α por sus siglas en inglés) y ROS. Las células presentadoras de antígenos, como las DCs, los macrófagos y las células B, incorporan y *cross*-presentan los antígenos tumorales a las células T, las cuales se activan mediante moléculas coestimuladoras. Por lo tanto, los mediadores inflamatorios anti-tumorales participan predominantemente en la fase de eliminación. Cuando se establece un equilibrio entre los mediadores inflamatorios pro-tumorales y anti-tumorales, los tumores progresan a la etapa de equilibrio. En la etapa de eliminación, el equilibrio de los mediadores inflamatorios está sesgado hacia los de tipo pro-tumorales ya que la inmunidad no limita el crecimiento tumoral (Zhang *et al*, 2017).

1.6 Neo-antígenos – Blancos interesantes para el desarrollo de nuevos tratamientos anti-tumorales

Los neo-antígenos tumorales son consecuencia de las alteraciones genéticas acumuladas por las células cancerosas durante el proceso de tumorigénesis. Se

ha demostrado que surgen de varios procesos que alteran las secuencias del marco abierto de lectura (*Open Reading Frame*, ORF por sus siglas en inglés) en el genoma. No solo las mutaciones con cambio de sentido tienen el potencial de crear ORFs alteradas, sino que también pueden hacerlo los transcritos de fusión, generados a partir de la transcripción de genes de fusión (Cai *et al*, 2012), los corrimientos del marco de lectura (Sampson *et al*, 2010) y las pérdidas de codones STOP. Estos neoORFs generados codifican nuevas secuencias de aminoácidos que no están presentes en el genoma normal, y que llevarán a la formación de neo-antígenos tumorales, que a su vez podrán constituir nuevos neo-inmunógenos (Desrichard *et al*, 2016).

El reconocimiento por parte del sistema inmune de los nuevos determinantes antigénicos, presentes en estos neo-antígenos, tiene el potencial de destruir tumores en desarrollo incluso antes de que éstos se vuelvan clínicamente aparentes y facilitar la eliminación inmune de tumores en crecimiento cuando se manipulan de una manera terapéutica apropiada (Ward *et al*, 2016). Es así que los neo-antígenos tumorales constituyen blancos óptimos para la inmunoterapia del cáncer.

1.7 Inmunoterapia del cáncer – Un punto de inflexión en la historia de los tratamientos anti-tumorales

El desarrollo de la inmunoterapia anti-tumoral fue un hito importante en los tratamientos actuales contra el cáncer. Desarrollos recientes de dicho abordaje terapéutico incluyen vacunas, citoquinas, anticuerpos bloqueantes de puntos de control y terapias de transferencia adoptiva de células inmunes.

Las vacunas contra el cáncer están diseñadas para aumentar la capacidad del sistema inmune de reconocer y destruir las células cancerosas e incluyen vacunas antigénicas, vacunas a DCs y vacunas de ácidos nucleicos, entre otras. En el caso

de las vacunas antigénicas, la terapia consiste en inyectar al paciente elementos específicos del cáncer para provocar respuestas inmunes contra el tumor. En principio, cuando se administra una vacuna a un paciente, los componentes de la vacuna activan las células presentadoras de antígenos profesionales, incluidas las DCs, quienes toman y procesan los antígenos administrados y luego migran a los ganglios linfáticos locales. Una vez en el ganglio linfático, la DC muestra el antígeno en la superficie de la célula a través de las moléculas de MHC de clase I o II, presentándolas a las células T en reposo, que se activan. Tras la unión del receptor del linfocito T (*T-Cell Receptor*, TCR por sus siglas en inglés) de un linfocito CD8⁺ al complejo péptido/molécula de MHC clase I de una DC, la célula T específica del antígeno se activa, prolifera y se diferencia en una célula T citotóxica efectora. Luego abandona el ganglio linfático y se dirige hacia la zona tumoral en donde reconocerá los antígenos que se muestran en la superficie del tumor. De manera similar, las células T CD4⁺, que reconocen péptidos en el contexto de moléculas de MHC de clase II, también pueden activarse. De manera similar a las vacunas clásicas, las vacunas de péptidos pueden estar compuestas de varios péptidos junto con un adyuvante. Hasta ahora, las vacunas de péptidos se han tolerado bien, con pocos eventos adversos relacionados con el tratamiento. Estos enfoques se están adaptando para dirigirlos a neo-antígenos específicos de tumores para crear vacunas terapéuticas contra el cáncer, personalizadas, a través de la formulación e inyección de péptidos sintéticos (Desrichard *et al*, 2016).

Las vacunas peptídicas que utilizan antígenos compartidos por células tumorales se han empleado como tratamientos experimentales para el melanoma metastásico, el carcinoma renal de células claras y otros tipos de tumores. Se administran solos o con un adyuvante inmunológico tal como una citoquina o un agonista de receptores de tipo Toll (*Toll-Like Receptors*, TLRs por sus siglas en inglés) para estimular el reconocimiento y la captación por parte de las DCs. Las vacunas de péptidos monovalentes consisten principalmente en antígenos

comunes altamente expresados por células de melanoma o cáncer de mama (por ejemplo, péptidos gp100, MART-1 y péptidos derivados de HER2 tales como GP2), así como antígenos normalmente expresados en tejidos privilegiados inmunológicamente como es el caso de los antígenos NY-ESO-1 y MAGE-A en los testículos (Scanlan *et al*, 2002; Desrichard *et al*, 2016).

Las citoquinas, como IL-2, IL-18, IL-21 y el factor estimulante de colonias de granulocitos (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*, G-CSF por sus siglas en inglés), también son adyuvantes comunes para la terapia del cáncer.

Las terapias que apuntan al bloqueo de los puntos de control inmunológicos son un enfoque revolucionario para la inmunoterapia del cáncer. La sobreexpresión del ligando de la molécula de muerte celular programada-1 (*Programmed Death-Ligand 1*, PD-L1 por sus siglas en inglés) en células tumorales se correlaciona con un mal pronóstico, y las inmunoterapias con anticuerpos anti-PD-1/PD-L1 y anti-CTLA-4 han mostrado resultados prometedores en una variedad de cánceres (Buchbinder *et al*, 2015; Pitt *et al*, 2016).

Recientemente, la inmunoterapia con células T con receptor de antígeno quimérico (*Chimeric Antigen Receptor-T Cells*, CAR-T por sus siglas en inglés), una estrategia inmunoterapéutica emergente, ha logrado un éxito sin precedentes en el tratamiento del cáncer, principalmente en tumores hemato-oncológicos como ser la leucemia linfoblástica aguda (Lee *et al*, 2015), la leucemia linfocítica crónica y linfomas de células B. Sin embargo, la terapia CAR-T aún no se usa ampliamente ya que su eficacia contra tumores sólidos es baja y porque puede inducir el síndrome de liberación de citoquinas, pudiendo poner en peligro la vida del paciente (Spill *et al*, 2016).

Dado que las inmunoterapias solo benefician a una fracción de pacientes, los esfuerzos continuos para descubrir biomarcadores predictivos de respuesta al tratamiento son críticos. Dichos avances clínicos también promueven el interés masivo en la búsqueda de nuevos blancos de inmunoterapia y en la comprensión

de los mecanismos de acción de fármacos actuales, por lo que podemos afirmar que la inmunoterapia anti-tumoral es un área de investigación sumamente activa y de la cual se espera un crecimiento exponencial.

1.8 *Trypanosoma cruzi* – Similitudes biológicas y antigénicas con células tumorales

El parásito protozoario flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), agente causal de la enfermedad de Chagas, es transmitido por insectos hematófagos pertenecientes a la familia Reduviidae y a la subfamilia Triatominae, los cuales pican a los huéspedes al mismo tiempo que depositan sus heces en un sitio próximo a la herida, facilitando de esta forma el ingreso de la forma infectiva del parásito en el organismo del huésped. El ingreso de los parásitos al huésped se da cuando el individuo se rasca la herida y expone el área de la lesión de la piel a la infección por dichos parásitos. A su vez, *T. cruzi* también puede ser transmitido a través de transfusiones sanguíneas, la ingesta de alimentos contaminados o por un pasaje de la madre al hijo a través de la placenta (D' Avila *et al*, 2012).

El ciclo de vida de *T. cruzi* es complejo y atraviesa varias etapas. En el intestino posterior de los triatomíneos, *T. cruzi* se diferencia a la etapa de tripomastigota metacíclico, el cual es eliminado con las heces durante la alimentación del insecto. Una vez dentro del huésped, los parásitos infectan varios tipos celulares, principalmente macrófagos, dentro de los cuales se diferencian a la etapa de amastigota y se dividen por fisión binaria. Los macrófagos son importantes en el transporte del parásito hacia otras partes del cuerpo (Barrett *et al*, 2003). Las formas amastigotas se diferencian a tripomastigotas, las cuales escapan de la célula produciendo la lisis celular y pudiendo infectar nuevas células o circular por el torrente sanguíneo hasta ser ingeridos por un insecto hematófago. Los tripomastigotas se diferencian a epimastigotas, los cuales se dividen y transitan

el camino al intestino medio del insecto para diferenciarse y volver a iniciar el ciclo (Figura 5).

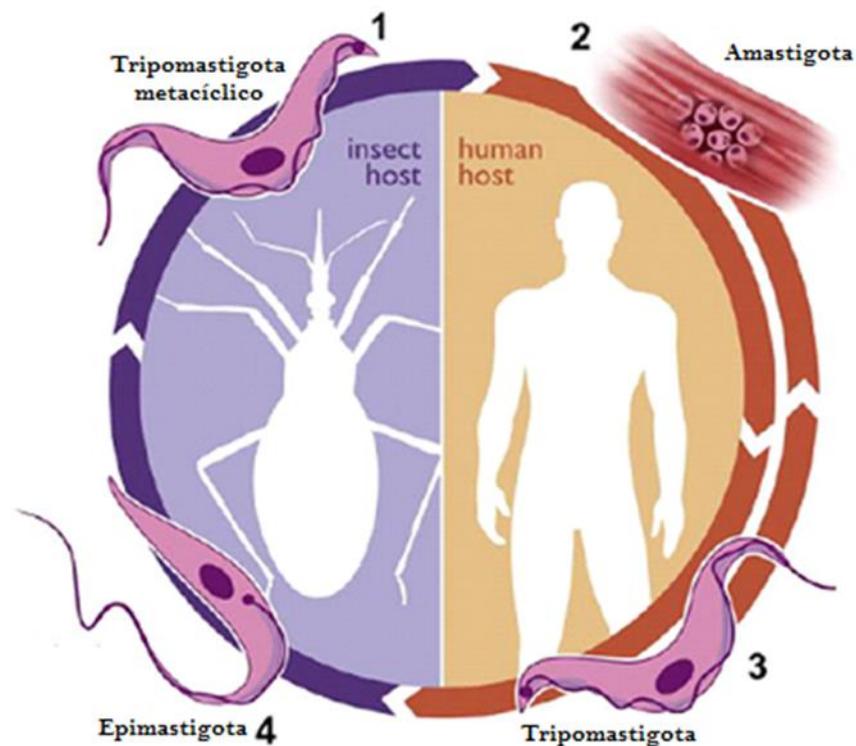


Figura 5. Ciclo de vida de *T. cruzi*. Se detallan las diferentes etapas en el ciclo de vida del parásito: tripomastigota metacíclico, amastigota, tripomastigota y epimastigota, según cuál sea su huésped. Modificado de Cuervo *et al*, 2009.

De los individuos infectados por *T. cruzi*, sólo 15-30% desarrolla manifestaciones clínicas (Barrett *et al*, 2003). La enfermedad de Chagas se caracteriza por tener una fase aguda, generalmente asintomática, pero en la cual pueden verse signos como fiebre, náuseas, diarrea e inflamación en el sitio de infección con una consecuente hinchazón conocida como chagoma. Sin embargo, existen casos severos de esta etapa donde pueden presentarse miocarditis, meningoencefalitis, linfadenopatía y hepatoesplenomegalia. Durante la fase aguda, la cual comienza luego de 6-10 días post-infección y puede extenderse entre 1-2 meses, los parásitos pueden ser fácilmente detectados en sangre periférica.

La fase aguda se caracteriza por desencadenar una fuerte respuesta inflamatoria. De manera de poder controlar la multiplicación del parásito. Células del linaje monocítico son movilizadas hacia los órganos blanco, principalmente el corazón. La diferenciación de estos monocitos lleva a la aparición de macrófagos con potencial fagocítico con habilidad de procesar y presentar antígenos, producir citoquinas y proveer señales co-estimuladoras que permitan el inicio de la respuesta inmune.

La fase crónica suele presentarse de forma indeterminada, es decir, asintomática. Esto se debe a una respuesta inmune adecuada generada frente a un bajo número de parásitos remanentes en el huésped. Por el contrario, son comunes las formas cardíaca, digestiva o nerviosa de la enfermedad que aparecen luego de 10-25 años. Los principales síntomas incluyen: dolor en el pecho, palpitaciones, mareos, arritmia, tromboembolismo, cardiomegalia, falla cardíaca y muerte súbita. Son también relevantes en algunos lugares geográficos los signos de megacolon y megaesófago chagásico produciendo constipación y disfagia, respectivamente (Barrett *et al*, 2003).

Hoy en día es claro el hecho de que existen mecanismos biológicos compartidos entre las células cancerosas y los parásitos que son fundamentales para la patogénesis de las enfermedades que originan. En particular, ambos se caracterizan por un fenotipo invasor, que requiere de la capacidad para establecer adhesiones célula-célula y célula-matriz, desarrollar proteólisis y presentar motilidad. Estas actividades son reguladas por interacciones mediadas por diferentes moléculas. De hecho, se ha observado que algunas de las moléculas que participan en los procesos de invasión y metástasis por las células cancerosas (integrinas, metaloproteasas de matriz y el receptor de la quimioquina RANTES), también pueden participar en mecanismos de invasión por parásitos (Lauwaet *et al*, 2000). También se puede observar semejanza entre células tumorales y parásitos a nivel de la capacidad que éstos presentan de desarrollar mecanismos de resistencia a diferentes drogas de uso terapéutico. En

particular, en parásitos protozoarios como *Plasmodium* y *Leishmania*, así como en células cancerosas, se ha identificado a la glicoproteína P, que confiere el fenotipo de multiresistencia a drogas (MDR) (Pérez-Victoria *et al*, 2002; Greenberg, 2013). También existen puntos en común entre las células cancerosas y los parásitos en los procesos que éstos utilizan para evadir la respuesta inmunológica desencadenada por el hospedero.

1.9 ¿Podría el *Trypanosoma cruzi* ser utilizado en la inmunoterapia anti-tumoral?

Como se mencionó anteriormente, las estrategias de inmunoterapia anti-tumoral buscan potenciar la actividad del sistema inmune del paciente de manera de poder erradicar a los tumores. Quizás uno de los pioneros en esta área haya sido el cirujano americano William Bradley Coley, quien en 1891 inyectó estreptococos en un paciente con cáncer para causar erisipela y estimular el sistema inmune. Como resultado de esto, el tumor del paciente desapareció, presumiblemente porque fue atacado por el sistema inmune. Este experimento comenzó el estudio de toda la vida de Coley sobre la inmunoterapia y durante los siguientes 40 años, trató a cientos de pacientes con sarcomas de hueso y tejidos blandos inoperables mediante inmunoterapia (McCarthy, 2006).

De manera interesante, y poniendo foco ahora en los parásitos, Grigorii Roskin y Exempliarskaia fueron los primeros en proponer en 1931 que la infección con *T. cruzi* podría inhibir el crecimiento de células tumorales (Roskin & Exempliarskaia, 1931). La idea de emplear una enfermedad para curar a otra ya tenía, en ese entonces, una historia muy larga, y los trabajos en donde se utilizaban infecciones agudas para curar tumores malignos se remontaban a la época de los experimentos de Coley. Sin embargo, la influencia más inmediata en el trabajo de Roskin fue probablemente el descubrimiento de la malarioterapia (Krementsov, 2009). En 1927, el psiquiatra austríaco Julius Wagner-Jauregg recibió un Premio

Nobel "por su descubrimiento de la importancia terapéutica de la vacunación con el agente causal de la malaria en casos de demencia paralítica", una forma de presentación de la sífilis terciaria (Julius Wagner-Jauregg, 1931).

Se creía que la malarioterapia estimulaba el sistema inmunitario del organismo de manera muy eficaz, siendo capaz de combatir no solo la malaria, sino también la sífilis terciaria que causaba la parálisis. Este tipo de estimulación no específica del sistema inmune se intentó utilizar contra una variedad de enfermedades, incluido el cáncer (Krementsov, 2009).

La elección de Roskin tuvo que ver probablemente con el hecho de que *T. cruzi* tiene un ciclo de vida muy peculiar, que tiene ciertas similitudes con el del *Plasmodium* de la malaria. A diferencia de organismos similares, que viven y se reproducen en el torrente sanguíneo del huésped, *T. cruzi* migra a diversos órganos, como el corazón, el hígado y el bazo, donde el parásito invade las células y se reproduce. Este tropismo por ciertos órganos particulares es lo que llevó a Roskin a plantear la hipótesis de que, debido a cierta especificidad biológica, los tumores podrían ser particularmente atractivos para el parásito (Krementsov, 2009).

Es así que llevaron adelante experimentos en los cuales se implantaron ratones con células tumorales de un carcinoma de Ehrlich y se los infectó con *T. cruzi*. De los 45 ratones utilizados en el experimento, los implantes desaparecieron por completo en 30 de ellos, mientras que en los restantes 15, los implantes mostraron una clara reducción de tamaño. Es así que Roskin concluyó que la infección por *T. cruzi* tuvo un efecto bioterapéutico en el crecimiento de carcinomas en ratones (Roskin & Exemplarskaia, 1931).

En experimentos posteriores, Roskin evaluó la actividad anti-tumoral de lisados de *T. cruzi* generados a partir de parásitos provenientes de animales infectados. Estos lisados contendrían una endotoxina parasitaria responsable de dicha actividad. Fue así que 19/43 animales no desarrollaron tumores en el grupo

tratado y 24/43 animales mostraron un período de latencia prolongado y un crecimiento tumoral lento en comparación al grupo control. Sorprendentemente, Roskin llegó a evaluar estos lisados en humanos. Tres pacientes con cáncer incurable de la faringe, elegidos porque los cambios podían observarse fácilmente, fueron inyectados periódicamente con el lisado mostrando mejoras considerables (Roskin, 1946).

Trabajos más recientes, que retomaron las ideas originales de Roskin & Exempliarskaia, arrojan resultados interesantes en la misma línea. En un estudio epidemiológico realizado en Brasil con 894 pacientes con megacolon chagásico, se observó que ninguno de ellos llegó a desarrollar algún tipo de neoplasia colónica, pese a que la inflamación asociada al megacolon se correlaciona positivamente con una mayor incidencia de cáncer colorrectal (Garcia *et al*, 2003). De manera interesante, se logró demostrar que el efecto inhibitorio directo de lisados de *T. cruzi* sobre el crecimiento de células de cáncer de mama humano cultivadas *in vitro*, es un fenómeno que difiere entre las distintas cepas del parásito (Sheklakova *et al*, 2003). En modelos de carcinogénesis química en rata administrando 1,2-dimetilhidrazina (DMH), se observó que la infección con el parásito protege a los animales contra el desarrollo de adenocarcinoma de colon, y que la mucosa colónica de los animales infectados se vio menos afectada por el tratamiento con DMH (Oliveira, 2001). Además, el grupo de Kallinikova demostró el papel de la inmunidad celular en el efecto antitumoral de *T. cruzi* mediante experimentos de transferencia pasiva de esplenocitos obtenidos a partir de animales inmunizados con un lisado del parásito. Este trabajo reportó características antigénicas comunes entre los antígenos de *T. cruzi* y los antígenos específicos de un adenocarcinoma de Ehrlich. Se demostró además que estos antígenos tienen epítomos comunes con mucinas de mamíferos y se logró reproducir el efecto onco-protector a través de la inmunización con mucinas de tipo II y III (Zenina *et al*, 2008).

Adicionalmente, productos derivados del parásito han mostrado la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral. Por ejemplo, una proteína recombinante equivalente a la glicoproteína gp82 del parásito ha mostrado tener actividad proapoptótica sobre células tumorales (Atayde et al, 2008) y la calreticulina de *T. cruzi* (TcCRT), expresada en el retículo endoplásmico y la membrana celular del parásito, se ha relacionado con propiedades anti-angiogénicas gracias a su capacidad de inhibir la proliferación de células endoteliales (Molina et al, 2005; López et al, 2010).

Resultados experimentales de nuestro grupo de investigación apoyan la hipótesis de que existirían ciertos epítomos compartidos entre el parásito y las células tumorales, siendo un candidato el antígeno de tipo mucínico sialil-Tn (α NeuAc2,6- α GalNAc-O-Ser/Thr), previamente caracterizado en *T. cruzi* (Freire T et al, 2003). Estas estructuras se han descrito en el contexto del cáncer y son de gran interés por varios motivos: podrían constituir marcadores diagnósticos útiles, se han visto implicadas en las metástasis organotrópicas de las células tumorales, se ha mostrado una relación directa entre la agresividad de ciertos carcinomas y la densidad de expresión de dichas moléculas y, por último, estos antígenos carbohidratos asociados a tumor pueden ser procesados por células T y presentados en el contexto de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, provocando de esta forma respuestas inmunes específicas (Osinaga, 2007). En esta línea, se demostró que anticuerpos dirigidos contra glicopéptidos simulando motivos mucínicos propios de *T. cruzi* y de células tumorales, inhibieron la capacidad del parásito de invadir fibroblastos y fueron capaces de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (*Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity*, ADCC por sus siglas en inglés) contra células de cáncer de mama de la línea MCF-7, con una reducción del 50% en la viabilidad celular (Campo, 2014).

Por otra parte, hemos logrado demostrar que existe actividad anti-tumoral por parte de lisados de la forma epimastigota de *T. cruzi*, en modelos de rata y ratón,

tanto en abordajes profilácticos como terapéuticos. Se ha evaluado la protección en modelos de carcinogénesis química en rata para tumores de colon y mama, inducidos por DMH y N-nitroso-N-metilurea (NMU), respectivamente (Ubillos *et al*, 2016), y en modelos de ratón con la línea de cáncer de pulmón LL/2. Interesantemente, para el caso del modelo de ratón se observó que dicha protección se perdía cuando el lisado era desglucosilado, revelando el rol que los antígenos carbohidratos podrían jugar en dicha protección. En cuanto a los mecanismos por los cuales se lograría esta protección, se vio que la inmunización con el lisado conduce a la activación de células dendríticas y al reclutamiento de linfocitos CD8⁺ y células NK hacia órganos linfoides secundarios. Además, se les confiere a las células del bazo una mayor capacidad citotóxica sobre las células LL/2 y se desencadena una respuesta humoral que involucra anticuerpos IgM e IgG (Monin, Tesis de Maestría, PEDECIBA Biología, 2011).

En suma, la actividad anti-tumoral de *T. cruzi* estaría dada tanto por la inducción de una respuesta inmune montada en respuesta a la infección como por ciertos componentes antigénicos y/o citotóxicos del parásito. Sin embargo, a pesar de los considerables avances en los efectos antineoplásicos de *T. cruzi*, los mecanismos subyacentes a la inhibición del crecimiento tumoral no son bien conocidos.

2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar nuevas estrategias de inmunoterapia anti-tumoral basadas en vacunas formuladas a partir de extractos de *Trypanosoma cruzi* en un modelo animal de relevancia clínica.

2.1 Objetivos específicos

- 1- Evaluación del potencial terapéutico de un extracto de proteínas de *Trypanosoma cruzi* en un modelo animal de cáncer de mama metastásico.
- 2- Estudio de la presencia de antígenos de reacción cruzada entre *Trypanosoma cruzi* y células tumorales por abordajes técnicos complementarios.
- 3- Caracterización de la respuesta inmune anti-tumoral observada y evaluación de aspectos propios del modelo animal.
- 4- Análisis del reconocimiento antigénico por parte de un suero de conejo anti-*Trypanosoma cruzi* sobre muestras humanas de diferentes tumores y tejidos normales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivo de parásitos

Se emplearon epimastigotas de la cepa Dm28c de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), los cuales fueron crecidos en estufa a 20°C en medio de cultivo LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB – Gibco®, Thermo Fischer Scientific), Hemina (Sigma-Aldrich) y los antibióticos Penicilina-Streptomina (Life Technologies). Los cultivos fueron escalados hasta un volumen de 1 L, hasta alcanzar una concentración del orden de 7×10^6 parásitos/mL, momento en el cual se procedió a la cosecha.

3.2 Lisis celular de *T. cruzi* y extracción de proteínas

Para la lisis celular de los parásitos se utilizó un *buffer* de lisis DOC conteniendo Glicina 0.15 M, NaCl 0.5 M, Desoxicolato de Sodio 1%, pH 9.0 con inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Mix – GE Healthcare Life Sciences) y DNAsa 0.02 mg/mL. Los parásitos fueron lavados dos veces con PBS 1X centrifugando a 3000 x *g* por 10 min. Se agregó 1 mL de *buffer* de lisis cada 1×10^9 parásitos y los mismos fueron mantenidos en rueda giratoria por 1 h a temperatura ambiente, luego 30 min a 37°C y por último 30 min a 4°C, también en rueda giratoria. El material extraído con el *buffer* de lisis DOC se centrifugó a 20.000 x *g* por 1 h a 4°C en una centrifuga Sorvall RC 6 Plus utilizando un rotor SS-34. El sobrenadante conteniendo las proteínas solubles en dicho *buffer* se alicuotó, se cuantificaron las proteínas por el método del ácido bicinconínico (BCA) y se almacenó a -80°C hasta el momento de su uso.

3.3 Cuantificación de proteínas

Las cuantificaciones de proteínas se realizaron por el método del BCA en placa de fondo plano de 96 pocillos. 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 soluciones del extracto de *T. cruzi* al 1/4, 1/8 y 1/16. Se agregaron 200 µL de una solución BCA-CuSO₄ 5% (Sigma-Aldrich) en relación 49:1 y se incubó la placa por 30 min a 37°C para leer, posteriormente, la absorbancia a 570 nm en un lector de placas Multiskan EX (Thermo Fischer Scientific).

3.4 Generación de suero de conejo anti-*T. 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 sub-cutánea (s/c) 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 oportunidades, espaciadas en el tiempo cada dos semanas. El suero fue colectado una semana después de la última inmunización y titulado por un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).

3.5 Líneas celulares

Células tumorales de origen murino 4T1 (cáncer de mama, cepa BALB/cJ) fueron adquiridas en American Type Culture Collection (ATCC). Las células fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM (High glucose, GlutaMAX™ Supplement – Thermo Fischer Scientific) suplementado con 10% SFB (Gibco®, Thermo Fischer Scientific), 1 mM de piruvato de sodio y 2 mM de L-Glutamina, en estufa a 37°C con atmósfera de 5% de CO₂. Los pasajes celulares se realizaron lavando las

células con PBS 1X e incubando con una solución de Tripsina 1X EDTA 0.05% (Life Technologies) por 5 min a 37°C.

3.6 Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas de las líneas celulares tumorales, se utilizaron células en fase exponencial de crecimiento. Se utilizó un *buffer* de lisis hipotónico conteniendo Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tritón X-100 1%, pH 7.0 con inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Mix – GE Healthcare Life Sciences) y DNAsa 0.02 mg/mL. Las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X centrifugando a 150 x *g* por 5 min. Se agregó 1 mL de *buffer* de lisis cada 5x10⁶ células. Se mantuvieron por 20 min en hielo, vortexeando cada 5 min y se procedió a sonicarlas con 6 pulsos de 10 seg de 15% de amplitud a intervalos de 10 seg de descanso en un sonicador Branson Ultrasonics Sonifier™ S-450 (Branson Ultrasonics). Se centrifugó el extracto a 14.000 *g* por 10 min a 4°C. El sobrenadante conteniendo las proteínas solubles en dicho *buffer* se alicuotó, se cuantificaron las proteínas por el método del BCA y se almacenaron los extractos en freezer a -80°C hasta el momento de su uso.

3.7 Ensayo de viabilidad celular

4x10³ células de la línea 4T1 fueron sembradas en DMEM (High glucose, GlutaMAX™ Supplement – Thermo Fischer Scientific) suplementado con 10% SFB (Gibco®, Thermo Fischer Scientific), 1 mM de piruvato de sodio y 2 mM de L-Glutamina en una placa de 96 pocillos. Se agregaron diferentes concentraciones del extracto de *T. cruzi* (0.05, 0.1, 0.2, 0.25, 0.4, 0.5, 0.8, 1 µg/µL) con el correspondiente control de *buffer* DOC, y se incubaron las células por 24, 48 y 72 h en estufa a 37°C en un atmósfera de 5% de CO₂. Finalizada la incubación, se agregaron 100 µL de una solución de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-

2,5-difeniltetrazol – Sigma-Aldrich) 0,5 mg/mL, se incubaron las placas por 3 h en estufa a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ y se procedió a la disolución de los cristales con una solución de HCl 0.1 N en isopropanol para la posterior lectura de la absorbancia a 490 y 570 nm en un lector de placas Multiskan EX (Thermo Fischer Scientific). Cada condición fue ensayada por cuadruplicado.

3.8 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12%, de espesor 1.5 mm, conteniendo 10 pocillos. Cada muestra se preparó utilizando *buffer* de muestra 6X, en un volumen final de 30 µL y colocando 30 µg de proteína por pocillo. Se utilizó un marcador de peso molecular de 10-250 kDa (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Fischer Scientific). Las muestras se corrieron a 120 mV hasta alcanzar el gel separador, para luego aumentar el voltaje a 180 mV. Los geles se utilizaron para *Western blot* o se tiñeron con una solución de Coomassie Blue R-250 (Sigma-Aldrich) 0.2% preparado en una solución de destain (45:45:10 Etanol, Agua destilada, Ácido acético).

3.9 Western blot

Las proteínas contenidas en los geles de poliacrilamida se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amershan Protran Premium 0.45 NC – GE Healthcare Life Sciences) mediante la técnica de transferencia semi-seca por 1 h a 150 mA en un TE 70 PWR Semi-Dry Unit (GE Healthcare Life Sciences) utilizando un buffer de transferencia conteniendo Glicina (Sigma-Aldrich) 192 mM, Trizma-Base (Sigma-Aldrich) 25 mM, 20% Etanol. Posteriormente se bloqueó la membrana con una solución PBS 1X, BSA 5% *over night* (O.N.) a 4°C. Se realizaron dos lavados con una solución de lavado conteniendo PBS 1X Tween-20 0.5% y se procedió a la incubación de los anticuerpos primarios por 1 h a temperatura ambiente. Se

lavó la membrana tres veces con solución de lavado y se incubó el anticuerpo secundario (Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP – Dako) en una dilución 1/10.000 en una solución con PBS 1X Tween-20 0.2% BSA 1% por 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron 5 lavados y se procedió al revelado incubando con 1 mL de solución de revelado (Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent – GE Healthcare Life Sciences) por 2 min en oscuridad a temperatura ambiente. La membrana se expuso por 15 min contra un film Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare Life Sciences). Se utilizó la solución de revelado Carestream® Kodak® autoradiography GBX developer/replenisher (Sigma-Aldrich) y la solución de fijación Carestream® Kodak® autoradiography GBX fixer/replenisher (Sigma-Aldrich). Como control positivo de la unión del anticuerpo, se migraron en el gel 5 µg del extracto de *T. cruzi*. Se usó como control negativo de la técnica un suero pre-inmune de conejo.

3.10 Preparación de láminas de células para ensayos de Inmunofluorescencia Indirecta

Se prepararon láminas conteniendo 2×10^3 células de la línea 4T1 por la técnica de *CytoSpin* utilizando una centrífuga Shandon 74000222 CytoSpin 3 Centrifuge (Whittemore Enterprises). Las láminas se centrifugaron por 10 min a 1.500 rpm, se fijaron en metanol-acetona 50% por 10 min y se secaron al aire para ser almacenadas a -20°C .

3.11 Evaluación de la reactividad del suero anti-*T. cruzi* sobre células tumorales 4T1 mediante Inmunofluorescencia Indirecta

Se utilizaron láminas de células 4T1 para realizar inmunofluorescencia indirecta. Se delimitó el círculo conteniendo el preparado celular con lápiz hidrofóbico, se hidrató dicho preparado por 10 min con PBS 1X y se incubó el suero de conejo

anti-*T. cruzi* por 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBS 1X sumergiendo en cámara por 5 min y se incubó el anticuerpo secundario (Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins/FITC Swine F(ab')₂ – Dako) en una dilución 1/100 en PBS 1X por 1 h a temperatura ambiente. Nuevamente se lavaron las láminas tres veces y se incubaron con una solución de DAPI (Sigma-Aldrich) en una concentración de 1 µg/mL en PBS 1X por 5 min en oscuridad. Se lavaron las láminas tres veces más y se montaron utilizando una gota de PBS 1X-Glicerol 50%. Las láminas se observaron en un microscopio de epifluorescencia Olympus IX81 utilizando el software µManager v 1.4.22.

3.12 Desarrollo del modelo animal

Los experimentos con animales fueron llevados a cabo en el bioterio libre de patógenos específicos (SPF) de la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación (UATE) del Institut Pasteur de Montevideo. Éstos fueron mantenidos en un ambiente controlado, con temperatura entre 19 y 21°C y ciclos de 14 h de luz y 10 h de oscuridad. Los animales fueron alojados en jaulas con filtro en un sistema de racks ventilados y recibieron agua y ración estéril, administradas en condiciones *ad libitum*.

Los diferentes protocolos de experimentación con animales utilizados en este trabajo fueron aprobados por el Comité de Ética en el Uso de Animales (CEUA) de dicho Instituto.

Para implementar modelos murinos de desarrollo tumoral, 7×10^4 células de la línea 4T1 fueron inyectadas en PBS 1X a nivel de la segunda glándula mamaria del flanco derecho de ratones BALB/cJ hembras de 8 semanas de edad por vía s/c en un volumen final de 100 µL.

Para el desarrollo del modelo terapéutico, se realizaron inmunizaciones a días 3, 7 y 10 post-inyección de células tumorales administrando diferentes dosis del

extracto de *T. cruzi* (150, 300, 600, 1200 µg) en presencia de hidróxido de aluminio como adyuvante (Alhydrogel® adjuvant 2% - InvivoGen), en el flanco izquierdo de los animales, por vía s/c. Se trabajó con grupos de $n=5$ animales. Los diámetros tumorales (D=diámetro mayor, d=diámetro menor) fueron controlados regularmente y el volumen tumoral se calculó según la siguiente fórmula:

$$Volumen\ tumoral = \frac{D * d^2}{2}$$

Por convención, se asumió como criterio de punto final un tamaño tumoral con un diámetro tumoral medio de entre 14 y 16 mm, siendo:

$$\overline{DT} = \sqrt[2]{D * d}$$

Para el desarrollo de un modelo terapéutico de mayor relevancia clínica, a los animales inyectados con las células 4T1 se les realizó una cirugía del tumor primario a día 16 para permitir el desarrollo de metástasis a distancia. Cabe aclarar que en estas condiciones todos los animales mueren en su evolución por metástasis pulmonares. A días 3, 7 y 10 post-cirugía, se administraron 300 µg del extracto de *T. cruzi* en presencia de hidróxido de aluminio como adyuvante (Alhydrogel® adjuvant 2% - InvivoGen), en el flanco izquierdo de los animales, por vía s/c. Se utilizó PBS 1X como control negativo. Se siguió a los animales periódicamente para controlar su sobrevida. Por convención, se asumió como criterio de punto final una pérdida de masa corporal mayor al 20% de la masa inicial del animal al momento de la primera inmunización, y/o la presencia de elementos de distrés respiratorio como ser frecuencia respiratoria aumentada o incapacidad respiratoria, producto de la presencia de metástasis pulmonares.

3.13 Evaluación de la reactividad de sueros anti-*T. cruzi* sobre células tumorales 4T1 mediante ensayos de tipo ELISA

Para los ensayos de tipo ELISA indirecto, ratones BALB/cJ hembras de 8 semanas de edad recibieron 3 inmunizaciones con 300 µg del extracto de *T. cruzi* utilizando hidróxido de aluminio como adyuvante (Alhydrogel® adjuvant 2% - InvivoGen) y *buffer* de lisis DOC como control, cada 2 semanas. 2 semanas después de la última inmunización los sueros fueron analizados por su reactividad contra *T. cruzi* y un animal de cada grupo se seleccionó para analizar su reactividad contra un extracto de células 4T1.

A su vez, ratones BALB/cJ hembras de 8 semanas de edad fueron inyectados con células tumorales de la línea 4T1 a día 0 a nivel de una de las glándulas mamarias. Se realizó una cirugía para remover el tumor primario a día 16. Como expresamos previamente, se realizaron tres inmunizaciones s/c los días 3, 7 y 10 post-cirugía. Cada inmunización consistió en la administración de 300 µg del extracto de *T. cruzi* utilizando hidróxido de aluminio como adyuvante (Alhydrogel® adjuvant 2% - InvivoGen) y *buffer* DOC como control. 3 días después de la última inmunización los sueros fueron analizados por su reactividad contra *T. cruzi* y un animal de cada grupo se seleccionó para analizar su reactividad contra un extracto de células 4T1.

Para el ELISA indirecto se sensibilizaron placas de fondo plano de 96 pocillos con 50 µL de los extractos de *T. cruzi* y 4T1, a una concentración final de 4×10^{-3} µg/µL en *buffer* carbonato (NaHCO₃-Na₂CO₃ 0.05 M, pH 9.6), dejándolas O.N. a temperatura ambiente. El bloqueo de sitios de unión inespecíficos se hizo con una solución de Gelatina (Sigma-Aldrich) 1% en PBS 1X por 1.30 h a 37°C. A continuación, se realizaron dos lavados con PBS 1X Tween-20 0.2 % y se procedió a la incubación de los sueros en diluciones seriadas al medio (1/100 – 1/12800) en PTG (PBS 1X, Tween-20 0.1%, Gelatina 0.5%) por 1 h a 37°C. Las placas se lavaron tres veces con solución de lavado y se incubó el anticuerpo secundario en una dilución 1/1000 por 1 h a 37°C. Se empleó un anticuerpo policlonal de cabra

anti-inmunoglobulinas totales de ratón conjugado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP) (Sigma-Aldrich). Se realizaron cinco nuevos lavados y se evidenció la actividad peroxidasa incubando los pocillos con el sustrato ABTS (2,2-azino-bis(ácido 3-etilbenzo-tiazolino-6-sulfónico) – Sigma-Aldrich) 5 mg/mL y H₂O₂ en *buffer* citrato-fosfato 0.1 M, pH 5.0 por 30 min a temperatura ambiente. La absorbancia se leyó a 405 nm en un lector de placas Multiskan EX (Thermo Fischer Scientific).

3.14 Evaluación de la reactividad del suero anti-*T. cruzi* sobre células tumorales 4T1 mediante citometría de flujo

Células tumorales de la línea 4T1 fueron resuspendidas en 1 mL de PFA 4% (Sigma-Aldrich) y se mantuvieron en hielo por 30min. Se agregaron 4 mL de PBS 1X y se centrifugaron por 5 min a 2.000 rpm. Las células fueron resuspendidas en PBS 1X, SFB 1% (condición de células sin permeabilizar) o en PBS 1X, SFB 1%, Tween-20 0.1% (condición de células permeabilizadas) a una concentración de 2x10⁶ células/mL.

A continuación se sembraron 100 µL de la suspensión celular en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo cónico, se centrifugó por 10 min a 2.500 rpm y se agregaron 50 µL por pocillo del suero de conejo anti-*T. cruzi*, suero pre-inmune de conejo (diluciones 1/200) y PBS 1X, incubándose los por 45 min a temperatura ambiente. Se lavaron las células tres veces con PBS 1X centrifugando a 2.000 rpm por 3 min y se procedió al revelado con el anticuerpo secundario (Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins/FITC Swine F(ab')₂ – Dako) en una dilución 1/50.

La expresión de moléculas pasibles de ser reconocidas por los anticuerpos anti-*T. cruzi* fue evaluada en un CYAN High-Performance Flow Cytometer

(DakoCytomation) utilizando un láser de 488 nm. Se utilizó el *software* FlowJo v 10.4.1.

3.15 Evaluación de la reactividad del suero de conejo anti-*T. cruzi* sobre tumores y metástasis pulmonares 4T1 mediante Inmunohistoquímica (IHQ)

Los tumores extraídos al día 16 y las metástasis pulmonares extraídas al día 29, fueron preparados en láminas de IHQ por la Dra. Cecilia Silva del Laboratorio de Anatomía Patológica del Servicio Médico Integral (SMI). Brevemente, se recibieron las muestras tumorales en formol al 10%, se realizó un estudio macroscópico tomando fragmentos representativos para la posterior inclusión en parafina, se obtuvieron cortes a 5 micras y se tiñeron con Hematoxilina y Eosina. Las muestras se examinaron en microscopio óptico y se procedió a la producción de láminas para el estudio por IHQ.

Se deparafinaron las muestras incubando las láminas tres veces en xilol por 5 min, luego tres veces en isopropanol por 5 min y por último 5 min en agua destilada. Se bloqueó la peroxidasa endógena utilizando Peroxidase and Alkaline Phosphatase Blocking Reagent (Dako) por 20 min a temperatura ambiente y se lavaron las láminas dos veces con *buffer* TBST (Tris 50 mM, NaCl 9%, Tween-20 0.05%). A continuación, se bloquearon los sitios inespecíficos utilizando un suero de cabra al 30% en una solución conteniendo Tris 50 mM, BSA 1%, pH 7.4, se incubaron las muestras por 30 min con el suero de conejo anti-*T. cruzi*, un suero de conejo pre-inmune (diluciones 1/100) o PBS 1X y se utilizó como anticuerpo secundario el *kit* EnVision+ Dual Link System HRP (Dako), también por 30 min. El marcado se evidenció utilizando DAB+ Substrate Chromogen System (3,3-diaminobencidina – Dako) como sustrato. Las muestras se tiñeron por 10 min con Hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich), se sumergieron 10 veces en una solución

de hidróxido de amonio 37 mM y se montaron con Bálsamo de Canadá Sintético (Biopack) para su observación en un microscopio Olympus CX41.

3.16 Ensayo clonogénico y conteo de células metastásicas

Ratones BALB/cJ hembras de 8 semanas fueron inyectadas con células 4T1 acorde al modelo animal. Se realizó un ensayo clonogénico a partir de pulmones, para evaluar cuantitativamente la presencia de metástasis en ratones tratados con el extracto de *T. cruzi* o con *buffer* de lisis DOC como control. Brevemente, los animales fueron eutanasiados por asfixia con CO₂ a día 29 post-inyección de células tumorales. El árbol bronquial fue transferido a una placa con medio de cultivo DMEM (High glucose, GlutaMAX™ Supplement – Thermo Fischer Scientific) suplementado con 10% SFB (Gibco®, Thermo Fischer Scientific), 1 mM de piruvato de sodio y 2 mM de L-Glutamina y los cinco lóbulos pulmonares fueron cortados en trozos de 2 x 2 mm. Se incubaron dichos trozos en una solución de Colagenasa D de *Clostridium histolyticum* (Roche- Sigma-Aldrich) 2 mg/mL por 1 h en estufa a 37°C en un atmósfera de 5% de CO₂. Pasada la hora se agregó EDTA (Sigma-Aldrich) 5 mM para cortar la reacción enzimática, se filtraron las muestras por un separador celular de 70 µm utilizando un émbolo estéril y se resuspendió la suspensión celular en un medio selectivo conteniendo 60 µM de 6-tioguanina (Sigma-Aldrich). Se sembraron diferentes diluciones de la suspensión celular en placas de 6 pocillos y se dejaron crecer las colonias por 12 días para luego teñirlas con cristal violeta por 5 min para ser contadas.

3.17 Evaluación *in vitro* de la actividad citotóxica de esplenocitos activados por el extracto de *T. cruzi*

5x10⁴ células de la línea 4T1 fueron sembradas en DMEM (High glucose, GlutaMAX™ Supplement – Thermo Fischer Scientific) suplementado con 10% SFB

(Gibco[®], Thermo Fischer Scientific), 1 mM de piruvato de sodio y 2 mM de L-Glutamina en una placa de 96 pocillos. Se agregaron diferentes cantidades de esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con 300 µg del extracto de *T. cruzi* en presencia de hidróxido de aluminio como adyuvante (Alhydrogel[®] adjuvant 2% - InvivoGen), y con *buffer* de lisis DOC ($n=5$ por grupo), para lograr relaciones de células efectoras (E) y tumorales (T) de 10:1, 5:1 y 2,5:1, respectivamente. Cada condición se realizó por triplicado. Se co-incubaron las células por 21 h en estufa a 37°C en un atmósfera de 5% de CO₂ y se procedió al agregado de 10 µL del reactivo WST-8 (2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio monosódico – Sigma-Aldrich) por pocillo con incubación de 3 h a 37°C para la posterior lectura de la absorbancia a 450 nm en lector de placas Multiskan EX (Thermo Fischer Scientific). El % de citotoxicidad se calculó según la fórmula:

$$\% \text{ citotoxicidad} = \frac{E_{\text{solos}} + T_{\text{solas}} - (E + T)}{T_{\text{solas}} - T_{\text{Tritón}}}$$

Con:

E_{solos} : Absorbancia de pocillos con esplenocitos solos

T_{solas} : Absorbancia de pocillos con células tumorales solas

E+T: Absorbancia de pocillos con mezcla de células tumorales y esplenocitos

$T_{\text{Tritón}}$: Absorbancia de pocillos con células tumorales incubadas con Tritón X-100

1%

3.18 Evaluación de la reactividad del suero de conejo anti-*T. cruzi* sobre muestras de tumores humanos mediante IHQ

Se realizó la misma IHQ descrita previamente, utilizando el suero de conejo anti-*T. cruzi* sobre distintos arrays comerciales: un array con 50 muestras de tumores de mama humanos con sus correspondientes metástasis en ganglio linfático drenante (BR10010e – US Biomax, Inc.), un array de 500 muestras de tejido tumoral de 20 órganos diferentes con el correspondiente tejido normal como control (MC5003b – US Biomx, Inc.), un array de 102 muestras de 35 tejidos humanos multi-normales (MNO1021 – US Biomax, Inc.), y por último, un array de 90 muestras de tumores de colon humanos con sus correspondientes tejidos no tumorales adyacentes, conteniendo datos de sobrevida de los pacientes (HCol-Ade180Sur-05 – US Biomax, Inc.). La evaluación del marcado se efectuó con los Dres. Dardo Centurión y Daniel Mazal de la Cátedra de Anatomía Patológica del Hospital de Clínicas de la Facultad de Medicina.

La intensidad del inmunomarcado de las muestras fue estudiada asignando valores para dicho marcado en una escala del 0 al 3 y considerando el % de área de células tumorales marcadas en función del total de la muestra (0-100%). Para un mejor análisis de los resultados, se construyó un *score* de inmunomarcación, producto de la multiplicación de la intensidad de marcado por el % de área marcada (0-300).

3.19 Extracción de ARN a partir de ganglios de ratones

Para poder realizar los estudios de expresión génica por qRT-PCR, fue necesaria la extracción de ARN a partir de los ganglios de animales sometidos al desafío tumoral. Para ello, se realizó una cirugía a día 16 y se extrajo el ganglio drenante del tumor, el cual fue almacenado en nitrógeno líquido inmediatamente. Dicho ganglio fue transferido a un mortero de cerámica conteniendo nitrógeno líquido para proceder a su pulverización. La pieza pulverizada fue transferida a un tubo

Eppendorf conteniendo 1 mL de Tri-Reagent® (Sigma-Aldrich) y se dejó reposando por 5 min a temperatura ambiente. A continuación se agregaron 200 µL de cloroformo/mL inicial de Tri-Reagent® y se vortexó la muestra por 30 seg. Luego de una incubación de 15 min a temperatura ambiente, se centrifugó la muestra por 15 min a 12.000 x *g* a 4°C. Se recuperó la fase acuosa en un nuevo tubo Eppendorf y se agregaron 500 µL de isopropanol/mL inicial de Tri-Reagent®. Se mezcló el tubo y se incubó la muestra por 15 min a temperatura ambiente, para después centrifugar por 15 min a 12.000 x *g* a 4°C. Posteriormente, se aspiró el sobrenadante y se agregó 1 mL de etanol 75% en agua ultrapura (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water – Thermo Fischer Scientific) en frío. Se mezcló suavemente invirtiendo el tubo Eppendorf y se centrifugó por 15 min a 7.500 x *g* a 4°C. Finalmente, se secó el pellet por 10 min a 56°C, se resuspendió en 90 µL de agua ultrapura y se incubó por 10 min a 42°C para facilitar la disolución del ARN. La concentración y la pureza de las muestras fueron controladas con un NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific) y almacenadas a -80°C hasta el momento de su uso. Como control, se utilizaron ganglios de animales naive.

3.20 Ensayos de expresión génica por qRT-PCR

Previo a la realización de las qRT-PCRs, se procedió de manera de realizar una retro-transcripción para obtener cDNA a partir del ARN extraído de los ganglios linfáticos drenantes de tumor. Para ello, 1 µg de ARN fue transcrito a cDNA utilizando la enzima M-MLV 200 U/µL (Invitrogen) como transcriptasa reversa y hexámeros aleatorios (Invitrogen). El cDNA fue analizado por PCR en tiempo real utilizando el reactivo SYBR Green (KAPA SYBR® FAST Universal qPCR Kit – KAPA BIOSYSTEMS) con una concentración final de primers de 200 nM en un equipo Eco Real-Time PCR System (Illumina). La beta-actina de ratón (*Actb*) fue utilizada como gen de referencia. Los siguientes primers fueron utilizados para cada gen:

Ctla4 forward 5'-TGGACTCCGGAGGTACAAAG-3', reverso 5'-CTGAAGGTTGGGTCACCTGT-3'; *Foxp3* forward 5'-GCGAAAGTGGCAGAGAGGTA-3', reverso 5'-TCCAAGTCTCGTCTGAAGGC-3'; *Cd274* (PD-L1) forward 5'-TGCTGCATAATCAGCTACGG-3', reverso 5'-ATGCTCAGAAGTGGCTGGAT-3'; *Actb* forward 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3', reverso 5'-GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA-3'. Los productos de amplificación obtenidos luego de realizada la qRT-PCR se migraron en un gel de agarosa al 2,5% para corroborar la identidad de las bandas obtenidas.

3.21 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el *software* GrapPad Prism 5. Los datos de supervivencia global fueron analizados mediante el test Log-rank (Mantel-Cox). Las variables cuantitativas se analizaron mediante el test de Student. Se consideraron estadísticamente significativos valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***)).

4. RESULTADOS

4.1 Generación del extracto de *T. cruzi*

De acuerdo a lo detallado en la sección materiales y métodos, se generó un extracto de *T. cruzi*, cuyas proteínas se cuantificaron por la técnica del BCA. Se generó un único lote de concentración 5 mg/mL con el cual se trabajó durante el presente trabajo.

4.2 Evaluación *in vitro* de la capacidad citotóxica del extracto de *T. cruzi* sobre células tumorales 4T1

A los efectos de evaluar los posibles mecanismos implicados en la eliminación de las células tumorales por parte de los extractos de *T. cruzi*, se procedió a estudiar *in vitro* el efecto citotóxico directo que podrían estar ejerciendo los componentes que forman parte de dicho extracto contra las células 4T1. Para ello se agregaron a cultivos de células tumorales diferentes cantidades del extracto parasitario, con los controles correspondientes de *buffer* DOC, y se incubaron por 24, 48 y 72 h. Finalizada la incubación, se agregaron 100 µL de una solución de MTT 0,5 mg/mL, se incubaron las placas por 3 h a 37°C y se procedió a la disolución de los cristales de formazán para la posterior lectura de la absorbancia a 570 nm.

Cabe aclarar que, en función de trabajos realizados previamente por el grupo, ya teníamos un indicio de que la actividad anti-tumoral del extracto de *T. cruzi* vendría dada por una activación del sistema inmune. Sin embargo, tratándose de una nueva línea celular tumoral y un nuevo modelo animal, y considerando que en la literatura ya se había reportado un efecto citotóxico causado por alguna endotoxina parasitaria, era necesario confirmar la suposición de que el extracto *per se*, vía un efecto citotóxico directo, no era el encargado de la eliminación tumoral.

Tal cual se observa en la Figura 6, y al comparar los valores de IC₅₀ de la tabla, el extracto no parece tener un efecto citotóxico directo sobre las células tumorales 4T1, para los tiempos de 24 y 72 h, en donde se comporta de manera similar al control. Si pareciera haber una diferencia para ciertas concentraciones del extracto en el tiempo de 48 h, con respecto al *buffer* DOC utilizado como control, cuando se analizan los gráficos de viabilidad celular en función del logaritmo de la concentración del extracto de *T. cruzi*, sin que esto repercuta en el valor final de IC₅₀.

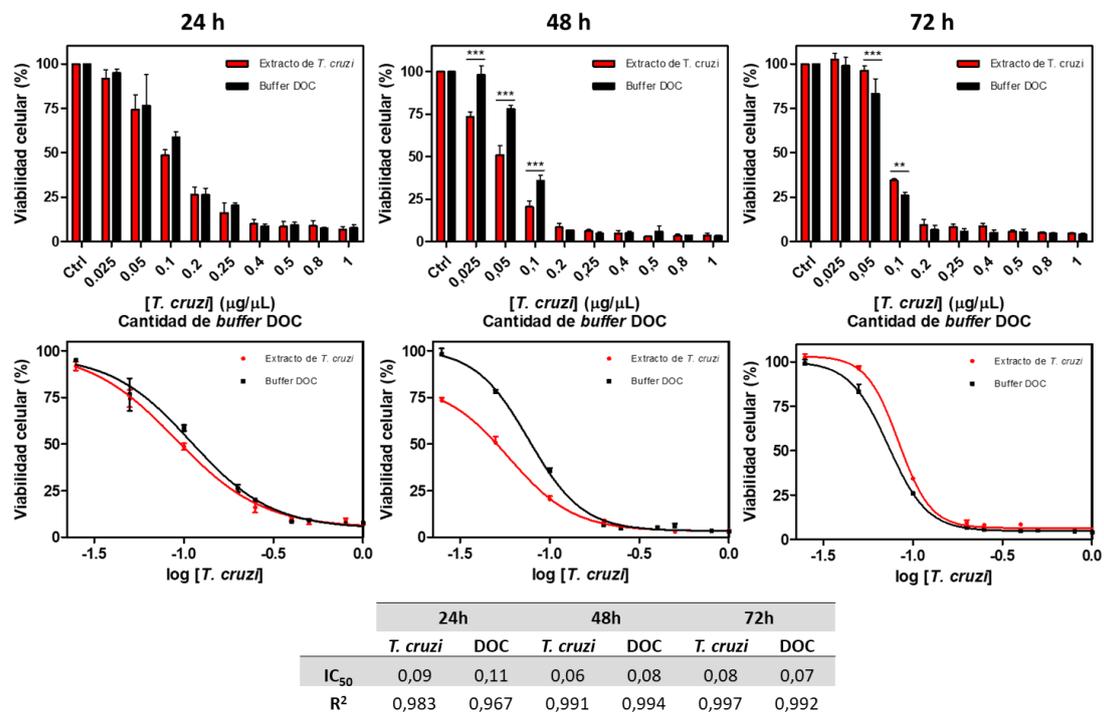


Figura 6. Evaluación *in vitro* de la capacidad citotóxica del extracto de *T. cruzi*. Se observa el % de viabilidad celular registrado por la técnica del MTT para células 4T1 en contacto directo con diferentes concentraciones del extracto de *T. cruzi* a 24, 48 y 72 h. En la tabla asociada se detallan los valores de IC₅₀ calculados para cada caso. $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***)

4.3 Evaluación *in vivo* del potencial terapéutico del extracto de *T. cruzi* sobre tumores 4T1

Los modelos experimentales *in vivo* en animales que recapitulen las neoplasias humanas sirven como valiosas herramientas para validar el perfil de eficacia y seguridad de nuevos agentes de inmunoterapia, antes de su transición a ensayos clínicos.

El carcinoma mamario 4T1, nuestro modelo de estudio elegido para la presente Tesis, es una línea celular tumoral trasplantable, originalmente aislado por Fred Miller y colaboradores en un ratón BALB/c (Dexter *et al*, 1978; Aslakson & Miller, 1992). Se caracteriza por ser resistente a la 6-tioguanina, por ser altamente tumorigénica e invasiva, por ser poco inmunogénica y, a diferencia de la gran mayoría de los modelos tumorales, el tumor primario puede originar metástasis espontáneas en múltiples sitios distantes, incluyendo nódulos linfáticos, hígado, cerebro, hueso y, principalmente, los pulmones.

El modelo tumoral 4T1 tiene varias características que lo hacen un modelo interesante. En primer lugar, las células tumorales son fácilmente trasplantables en la glándula mamaria, por lo que el tumor primario crece en el sitio anatómico correcto e incluso se lo podría considerar un modelo ortotópico. A su vez, el tumor primario puede ser extirpado quirúrgicamente fácilmente, de manera de estudiar la enfermedad metastásica residual, tal cual ocurre en el escenario clínico. Adicionalmente, la dinámica de la carcinogénesis de los tumores 4T1 establecidos en ratones BALB/cJ inmunocompetentes es comparable al cáncer de mama humano en estadio IV. Todo esto lo hace un modelo de interés para evaluar nuevas estrategias de inmunoterapia anti-tumoral.

En primera instancia se buscó determinar la dosis óptima de trabajo con la cual inmunizar a los animales en futuros experimentos. Para esta puesta a punto, se llevó a cabo un ensayo del modelo animal de desarrollo tumoral en el cual se inyectó a los animales con 7×10^4 células tumorales de la línea 4T1 por vía sub-

cutánea (s/c) a nivel de la segunda glándula mamaria del flanco derecho de ratones BALB/cJ hembras de 8 semanas de edad. A los animales se les administraron por vía s/c, y en el flanco opuesto al sitio de inyección tumoral, diferentes dosis del extracto de *T. cruzi* a días 3, 7 y 10 post-inyección de células tumorales (Figura 7A). A los animales se les controló periódicamente el volumen tumoral (Figura 7B) y se los siguió para evaluar la sobrevida global (Figura 7C).

Como se observa en la Figura 7B, todos los tumores, independientemente de la dosis de extracto de *T. cruzi* administrada, crecieron a igual ritmo, alcanzando tamaños similares. Lo mismo ocurrió con la sobrevida, para la cual no se observaron diferencias entre los distintos grupos de animales (Figura 7C).

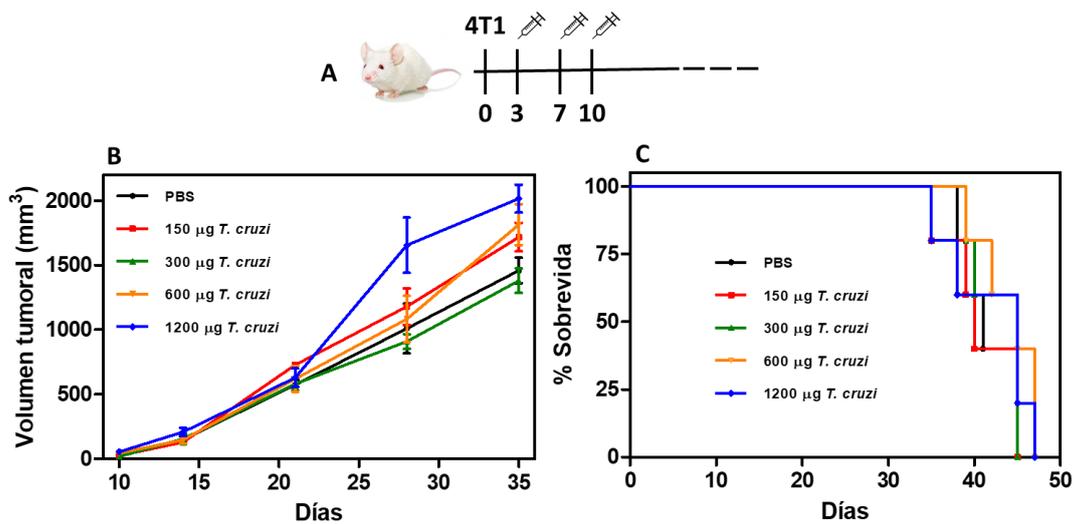


Figura 7. Puesta a punto de la dosis óptima de extracto de *T. cruzi* a utilizar durante el protocolo de inmunización. Animales BALB/cJ fueron inyectados con 7×10^4 células 4T1 por vía s/c y se inmunizaron con el extracto de *T. cruzi* (A). Se muestran las curvas de crecimiento tumoral (B) y sobrevida (C) para las diferentes dosis empleadas.

Con el objetivo de evaluar nuestra estrategia de inmunoterapia en un contexto de mayor relevancia clínica, que permitiera acercarnos a modelos de investigación pre-clínica, se inyectó a los animales con células tumorales de la línea 4T1 por vía s/c a nivel de la segunda glándula mamaria del flanco derecho de ratones BALB/cJ hembras de 8 semanas de edad, se realizó una cirugía del

tumor primario a día 16, removiendo además el ganglio linfático drenante de tumor y toda la grasa peri-tumoral, y se les administraron 300 µg del extracto de *T. cruzi* a días 3, 7 y 10 post-cirugía (Figura 8A). Los animales fueron inyectados con 5×10^5 células 4T1 (Figura 8B) o con 7×10^4 células 4T1 (Figura 8C). En ambos casos se los controló para evaluar la sobrevida global.

Tal cual se observa en la Figura 8B, el extracto de *T. cruzi* no logra proteger a los animales, y los animales de ambos grupos alcanzan los criterios de punto final a igual tiempo, muriendo por causa de la insuficiencia respiratoria ligada a las metástasis pulmonares.

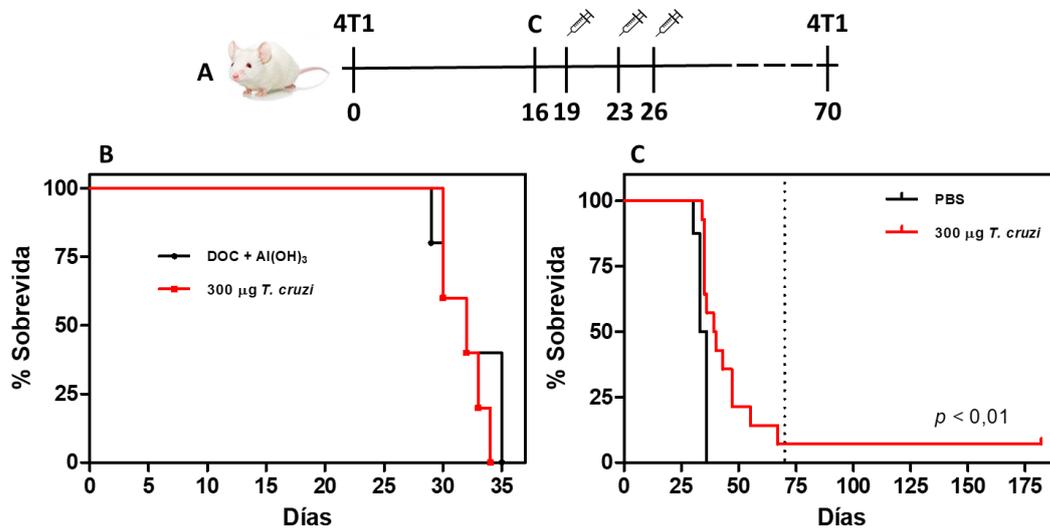


Figura 8. Evaluación *in vivo* del potencial terapéutico del extracto de *T. cruzi* en el modelo 4T1. Animales BALB/cJ fueron inyectados con células tumorales 4T1, sometidos a una cirugía para remover el tumor primario y se inmunizaron con el extracto de *T. cruzi* (A). Se muestran las curvas de sobrevida para la inyección de 5×10^5 (B) y 7×10^4 (C) células tumorales 4T1. La línea punteada en C denota la re-inoculación de 7×10^4 células 4T1 a día 70.

Sin embargo, y como se muestra en la Figura 8C, cuando se inyectan 7×10^4 células 4T1, el grupo inmunizado con el extracto de *T. cruzi* responde al tratamiento. Podemos observar que aproximadamente un 50% de los animales de este grupo se comporta de igual manera que el grupo control (mediana de sobrevida = 34,5 días), alcanzando los criterios de punto final en el entorno del día 35; un 40% de los animales aumenta su sobrevida de manera estadísticamente significativa,

pero eventualmente terminan alcanzando los criterios de punto final y mueren; y un 10% de animales no sólo se cura, sino que además rechazan un nuevo desafío tumoral a día 70 con 7×10^4 células 4T1 (señalado con una línea punteada), alcanzando tiempos de supervivencia considerablemente altos y sin mostrar signos de dificultades respiratorias que evidencien la presencia de focos metastásicos a nivel de los pulmones (Figura 8C).

4.4 Evaluación *in vitro* del reconocimiento de antígenos tumorales por parte de un suero de conejo anti-*T. cruzi* por abordajes técnicos complementarios

4.4.1 Evaluación del reconocimiento por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Con el objetivo de evaluar la capacidad del suero de conejo anti-*T. cruzi* de reconocer estructuras antigénicas presentes en células tumorales 4T1, se llevaron a cabo ensayos de IFI. Las células se prepararon en láminas de vidrio por la técnica de *CytoSpin* y se las incubó con el suero anti-*T. cruzi* en una dilución 1/100 (Figura 9, Panel A). Como control negativo se utilizó un suero pre-inmune de conejo, también en una dilución 1/100 (Figura 9, Panel B).

Como se puede observar en la Figura 9A, el suero reconoce estructuras antigénicas presentes en las células 4T1, observándose un marcado con un patrón citoplasmático difuso. Este reconocimiento es heterogéneo, encontrándose áreas de células para las cuales el marcado es intenso y otras que aparecen sin marcar. De manera contraria, el suero pre-inmune no arroja marcado alguno, confirmando que son los anticuerpos generados contra el extracto de *T. cruzi* los que están reconociendo los antígenos tumorales (Figura 9B).

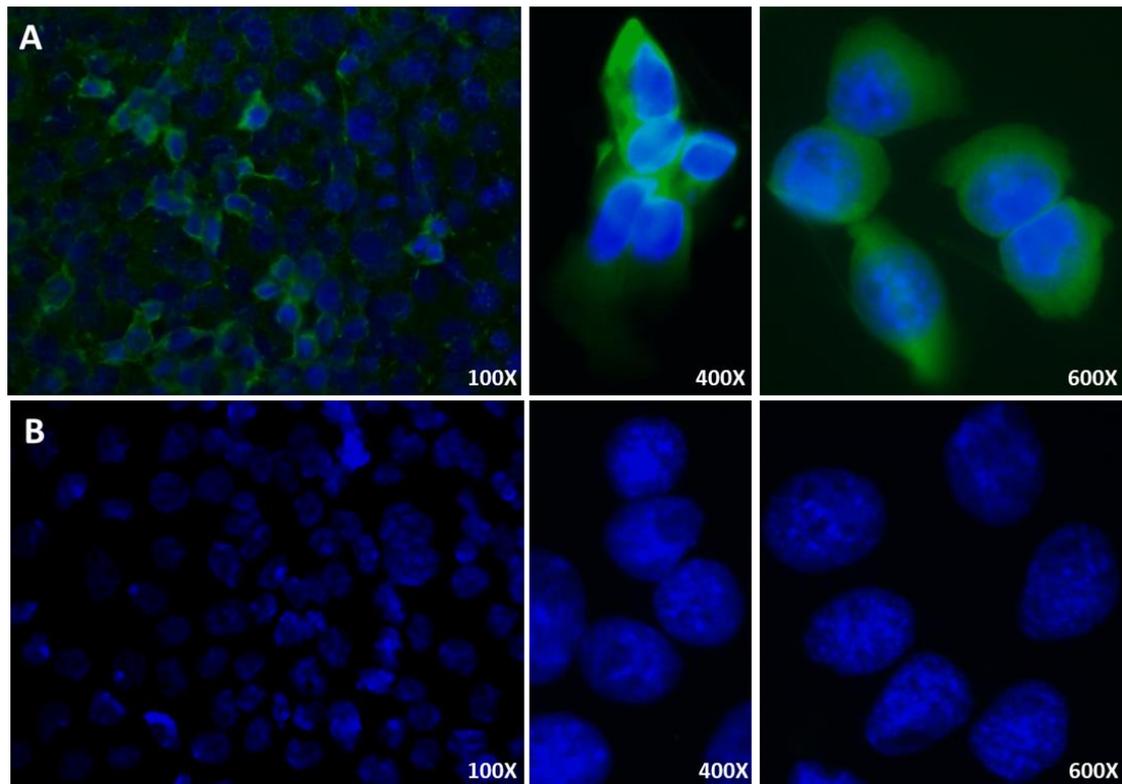


Figura 9. Evaluación *in vitro* del reconocimiento de antígenos tumorales por IFI. Se muestra el reconocimiento de antígenos tumorales sobre células de la línea 4T1 por parte de un suero de conejo anti-*T. cruzi* (A) y, como control negativo, del correspondiente suero pre-inmune de conejo (B).

4.4.2 Evaluación del reconocimiento por Citometría de Flujo

Con el fin de determinar si existía un reconocimiento de estructuras antigénicas sobre la superficie de las células tumorales 4T1, se realizó citometría de flujo utilizando el suero de conejo anti-*T. cruzi*, un suero pre-inmune de conejo y PBS como control. Para ello se marcaron las células con una dilución 1/200 de los sueros y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a FITC.

Como se puede apreciar en la Figura 10A, considerando la media geométrica de intensidad de fluorescencia, el marcado con el control negativo fue prácticamente nulo ($10,78 \pm 6,92$). El suero pre-inmune de conejo marcó las células 4T1 ($59,87 \pm 1,16$), pero en mayor medida y con una diferencia estadísticamente significativa lo hizo el suero de conejo anti-*T. cruzi* ($117,0 \pm 6,1$).

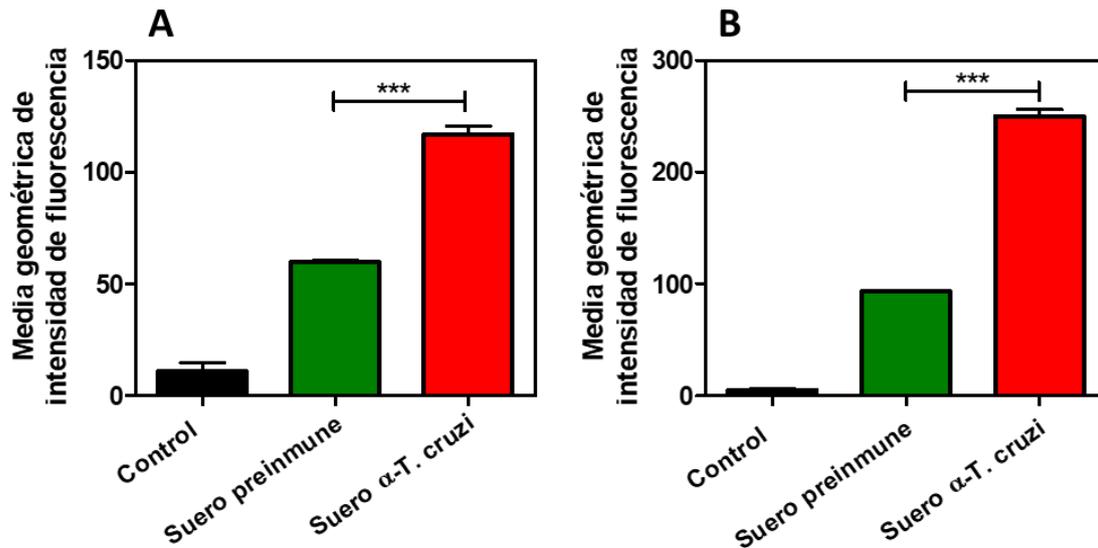


Figura 10. Evaluación *in vitro* del reconocimiento de antígenos tumorales por citometría de flujo. Se muestra el reconocimiento de antígenos tumorales sobre células de la línea 4T1 por parte de un suero de conejo anti-*T. cruzi*, un suero pre-inmune de conejo y un control negativo sin anticuerpo primario, correspondientes al marcado de células tumorales sin permeabilizar (A) y permeabilizadas (B). $p < 0.0001$ (***)

De manera interesante, cuando las células fueron permeabilizadas con Tritón X-100 0,1% para lograr un marcado intracelular, la media geométrica de intensidad de fluorescencia aumentó y el marcado con el suero de conejo anti-*T. cruzi* resultó ser el de mayor valor ($250 \pm 10,6$), manteniendo la diferencia estadísticamente significativa con respecto al suero pre-inmune ($93,07 \pm 1,59$) y al control ($4,94 \pm 1,59$) (Figura 10B). Este resultado es coherente en tanto la permeabilización expone antígenos intracelulares previamente ocultos. Igualmente es importante destacar que en una respuesta inmune anti-tumoral *in vivo*, serían principalmente los antígenos de superficie los que estarían siendo reconocidos por el sistema inmune y contra los que se montarían las respuestas celulares citotóxicas.

4.4.3 Evaluación del reconocimiento por *Western blot*

Con el fin de caracterizar de una manera más fina las proteínas que están siendo reconocidas por el suero de conejo anti-*T. cruzi*, se llevaron adelante ensayos de *Western blot*. Se migraron los extractos proteicos de las células parasitarias y de células tumorales 4T1, y se los transfirió a una membrana de nitrocelulosa para enfrentarlos contra el suero anti-*T. cruzi*, una fracción IgG de dicho suero, y un suero pre-inmune de conejo como control negativo (dilución 1/750).

Los resultados de este experimento se pueden observar en la Figura 11. Claramente, y en concordancia con los resultados obtenidos hasta el momento, el suero anti-*T. cruzi* reconoce una gran variedad de antígenos en las células tumorales, al igual que lo hace la fracción IgG de dicho suero. De manera interesante, la fracción IgG del suero anti-*T. cruzi* no reconoce antígenos parasitarios. Al comparar el patrón de bandas obtenido para los carriles del extracto de 4T1 entre el suero anti-*T. cruzi* y el suero pre-inmune, vemos que existen bandas presentes en uno y no en el otro, o cuya intensidad varía, ya sea aumentando o disminuyendo, lo que nos podría estar hablando de la presencia de neo-antígenos tumorales o antígenos asociados a tumor que estén siendo reconocidos por los anticuerpos anti-*T. cruzi*. Como era de esperar, el control negativo del suero pre-inmune no logra reconocer al extracto de *T. cruzi* mientras que el control sin anticuerpo primario no reconoce ninguno de los extractos celulares.

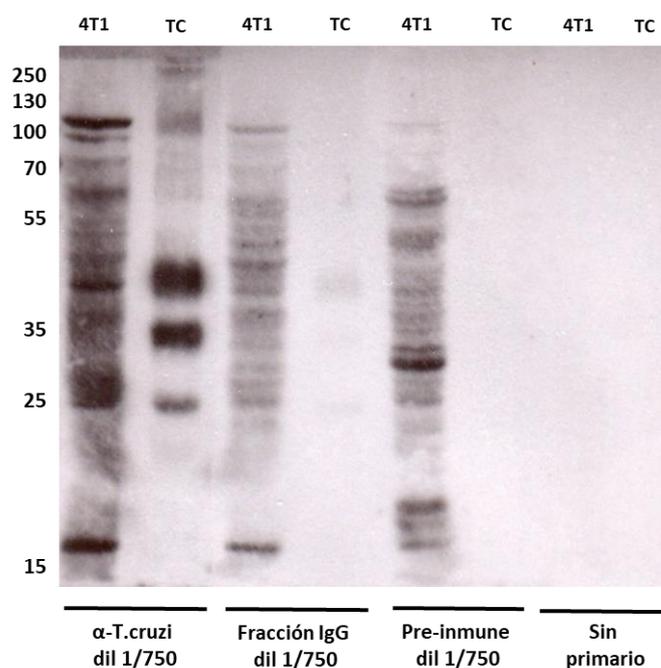


Figura 11. Evaluación *in vitro* del reconocimiento de antígenos tumorales por *Western blot*. Se muestra el reconocimiento antigénico por parte de un suero de conejo anti-*T. cruzi*, la fracción IgG de dicho suero, un suero pre-inmune de conejo y un control negativo sin anticuerpo primario sobre un extracto de proteínas de la línea celular 4T1 y un extracto de proteínas de *T. cruzi* (TC).

4.4.4 Evaluación del reconocimiento por Inmunohistoquímica (IHQ)

A los efectos de evaluar el reconocimiento antigénico por parte del suero de conejo anti-*T. cruzi* en un contexto tisular, procedimos de manera de realizar IHQ sobre cortes de tumores 4T1 y las metástasis pulmonares de dichos tumores.

Para ello, tumores extraídos al día 16 y pulmones extraídos a día 29, fueron fijados e incluidos en parafina, tal cual se detalla en la sección materiales y métodos. Las láminas generadas fueron tratadas con el suero de conejo anti-*T. cruzi* y un suero pre-inmune en una dilución 1/100.

Con respecto a los tumores primarios, en la Figura 12A y 12C se pueden observar cortes representativos correspondientes a dos animales diferentes en los que se ve cómo el suero anti-*T. cruzi* logra marcar las células tumorales intensamente, con un patrón citoplasmático difuso y un fuerte componente peri-nuclear en

alguna de las células. Por el contrario, el suero pre-inmune de conejo no marca las células tumorales (Figura 12E).

Evaluando la tinción a nivel de las metástasis pulmonares, en la Figura 13A y 13D vemos cómo el suero anti-*T. cruzi* marca claramente las células tumorales, sin marcar los neumocitos adyacentes, lo cual constituye un control interno sumamente valioso. El patrón pareciera ser citoplasmático difuso, siendo el marcado peri-nuclear mucho más intenso y frecuente en comparación a lo que se observó en tumores primarios. En este caso el control negativo se realizó sobre cortes consecutivos de las mismas muestras, y se puede ver en la Figura 13C y 13F que no hay marcado tumoral.

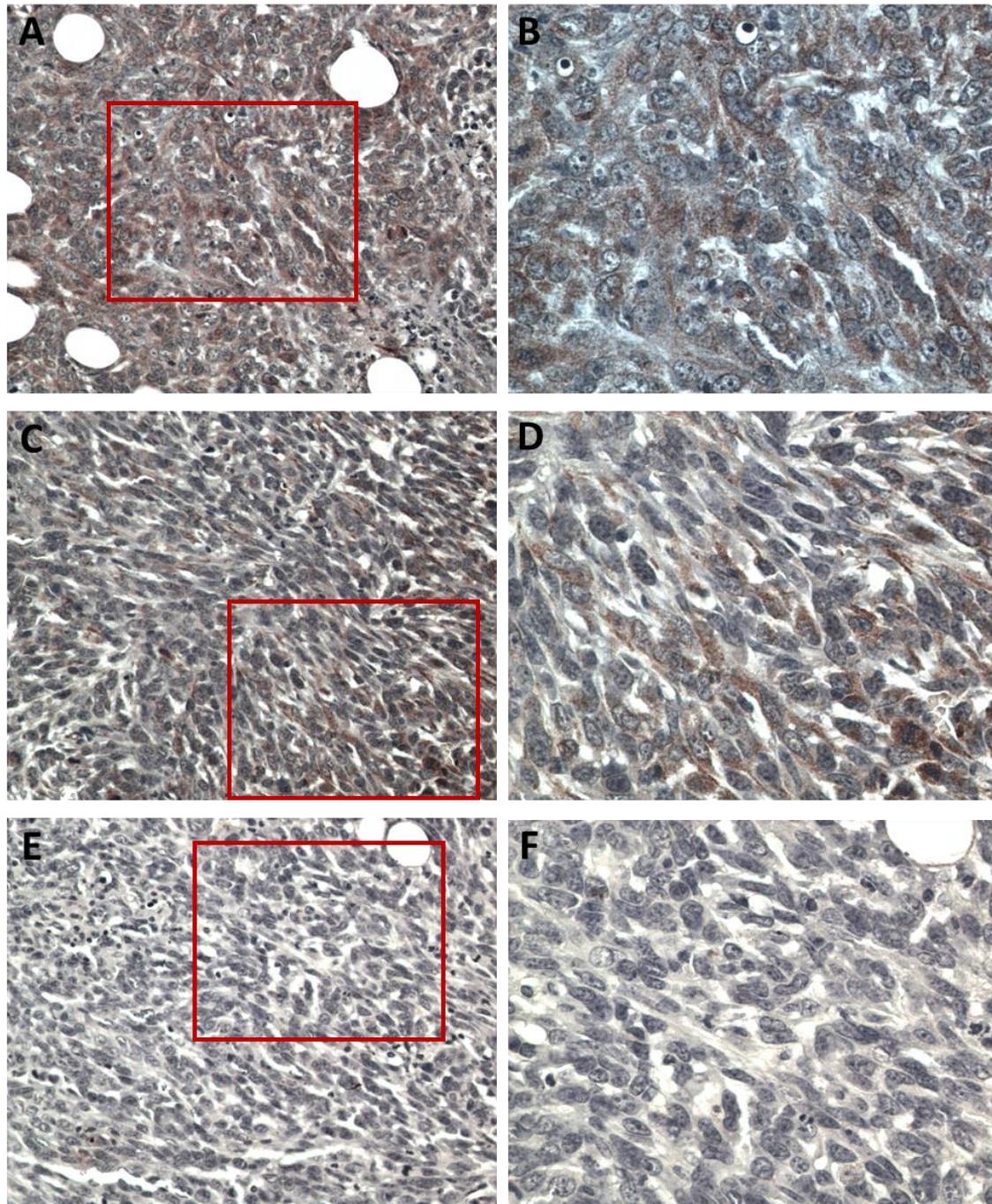


Figura 12. Evaluación *in vitro* del reconocimiento del suero de conejo anti-*T. cruzi* de antígenos de tumores 4T1 por IHQ. Se muestra el reconocimiento antigénico a un aumento 100X sobre tumores 4T1 por parte de un suero de conejo anti-*T. cruzi* (A, C) y como control negativo el correspondiente suero pre-inmune de conejo (E). B, D y F corresponden al aumento 200X de las áreas detalladas en rojo en A, C y E, respectivamente.

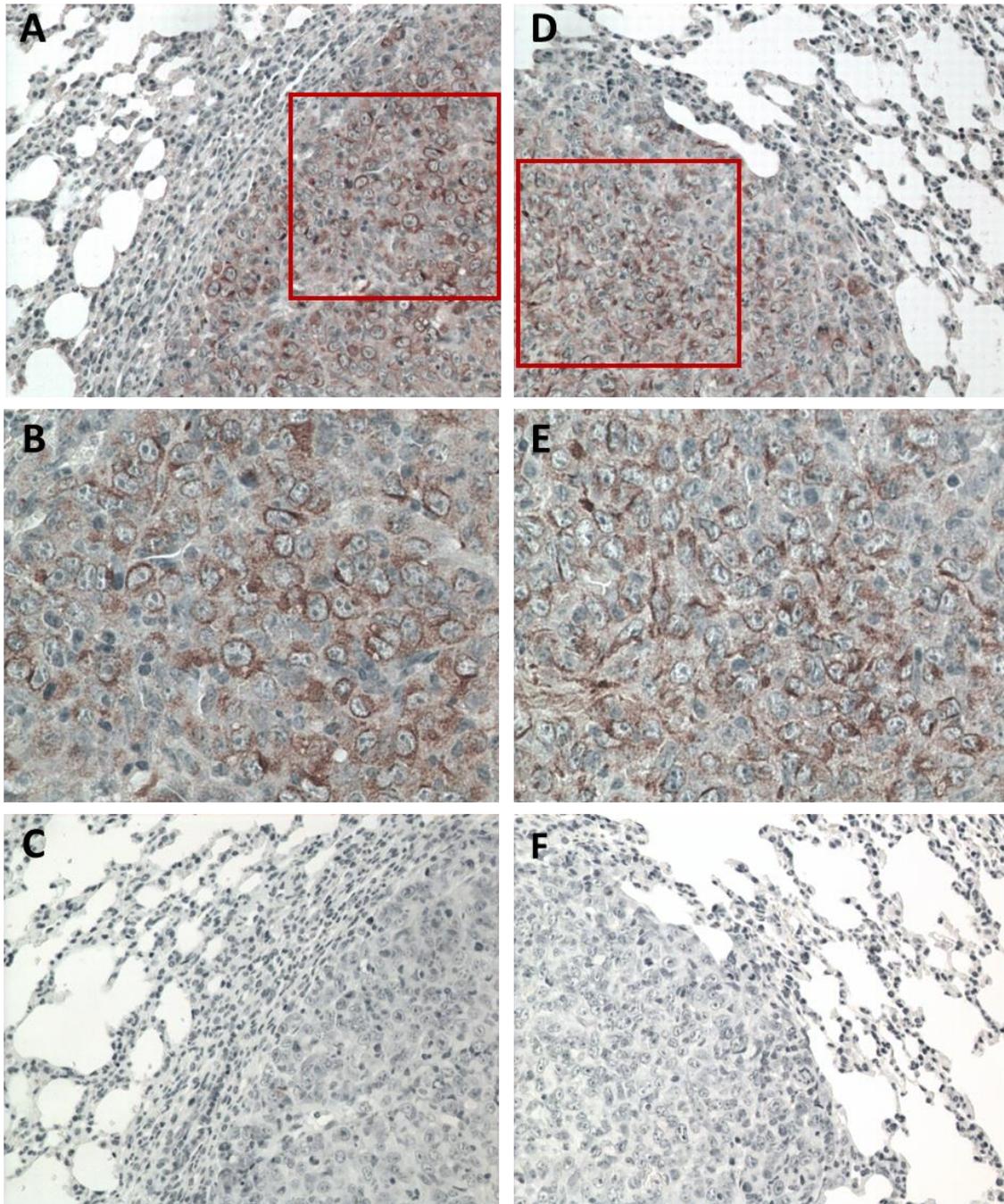


Figura 13. Evaluación *in vitro* del reconocimiento del suero de conejo anti-*T. cruzi* de antígenos de metástasis pulmonares originadas a partir de tumores 4T1 por IHQ. Se muestra el reconocimiento antigénico a un aumento 100X sobre metástasis pulmonares de células 4T1 por parte de un suero de conejo anti-*T. cruzi* (A, D) y como control negativo el correspondiente suero pre-inmune de conejo (C, F). B y E corresponden al aumento 200X de las áreas detalladas en rojo en A y D, respectivamente.

4.5 Evaluación *in vitro* de la capacidad citotóxica de esplenocitos murinos sobre células tumorales

La citotoxicidad celular es un componente importante de muchas terapias anti-tumorales. De manera de determinar el eventual papel de los linfocitos en la eliminación de células tumorales, llevamos a cabo ensayos *in vitro* de citotoxicidad celular co-cultivando esplenocitos de animales inmunizados con el extracto de *T. cruzi* y *buffer* DOC como control, con células 4T1, en diferentes relaciones de células efectoras (E) y tumorales(T).

Como se puede apreciar en la Figura 14A, la capacidad citotóxica de los esplenocitos de animales tratados con *T. cruzi*, medida por el método del WST-8, es mayor para las relaciones E:T de 5:1 y 2,5:1. De manera interesante, cuando los resultados los analizamos de manera individualizada, esto es, animal por animal, vemos que en lugar de observar un continuo de respuestas, pareciera haber animales que responden al tratamiento y animales que no lo hacen. Esto queda más claro sobre todo para la relación 5:1, donde las diferencias son significativas y registramos dos animales que alcanzaron niveles de citotoxicidad celular cercanos al 80% (Figura 14B).

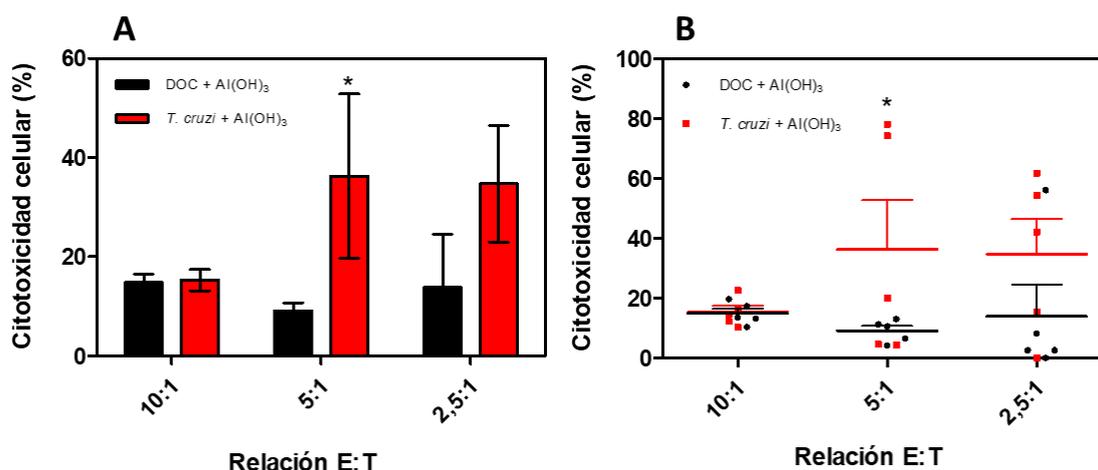


Figura 14. Evaluación *in vitro* de la capacidad citotóxica de esplenocitos murinos sobre células tumorales 4T1. Se observa el % de citotoxicidad celular registrado por la técnica del WST-8 para células 4T1 en contacto directo con diferentes relaciones de esplenocitos provenientes de animales inmunizados con el extracto de *T. cruzi* y con *buffer* DOC. En A se aprecian los resultados por grupo de animales y en B se detallan los resultados de manera individual. $p < 0.05$ (*)

Llama la atención el resultado para la relación E:T 10:1; uno esperaría que a mayor número de esplenocitos por célula tumoral los valores de citotoxicidad observados fuesen mayores.

4.6 Evaluación del reconocimiento de antígenos tumorales por parte de sueros de ratón anti-*T. cruzi*

Una vez puesto a punto el modelo animal, nos preguntamos si los sueros de ratones inmunizados con el extracto de *T. cruzi* podrían reconocer estructuras antigénicas presentes no sólo en dicho extracto, sino también en un extracto de células tumorales 4T1.

Para responder a dicha pregunta, se inmunizaron ratones BALB/cJ hembras cada dos semanas en tres oportunidades, y dos semanas después se sangraron los animales (Figura 15A). Se evaluó la reactividad de dichos sueros por ELISA indirecto contra un extracto de *T. cruzi* (Figura 15B) y contra un extracto de 4T1 (Figura 15C).

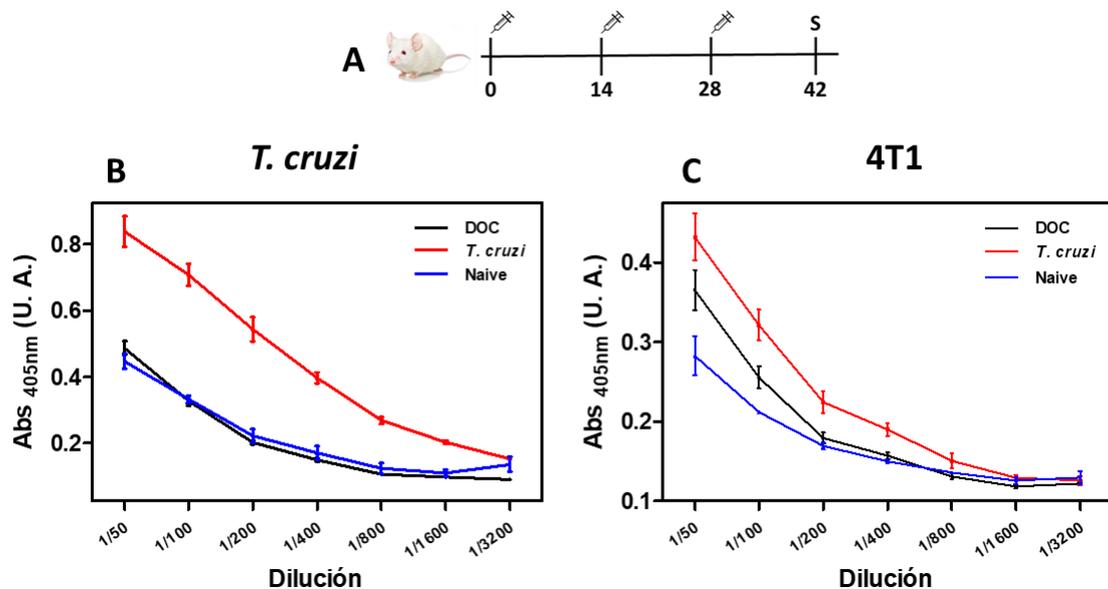


Figura 15. Evaluación *in vitro* del reconocimiento de antígenos parasitarios y tumorales por ELISA indirecto. Animales BALB/cJ fueron inmunizados con 300 µg del extracto de *T. cruzi* cada dos semanas y se obtuvieron los sueros (A). Se analizó por ELISA indirecto la reactividad de dichos sueros contra extractos de proteínas de *T. cruzi* (B) y células tumorales 4T1 (C).

Como se puede apreciar en la Figura 15B, los sueros de ratón anti-*T. cruzi* logran reconocer el mismo extracto de *T. cruzi*, mientras que los sueros de los animales control (*buffer* DOC) y los sueros de dos animales *naive* lo reconocen en menor medida. Para el caso del extracto de 4T1, en la Figura 15C se puede ver cómo el comportamiento diferencial de los sueros no es tan acentuado, aunque los sueros de animales inmunizados con el extracto de *T. cruzi* presentan valores de absorbancia más altos que marcan una tendencia.

De manera de evaluar la reactividad de los sueros, ahora en ratones que hayan sido sometidos al desafío tumoral y siguiendo un protocolo de inmunizaciones similar al empleado para la evaluación de la inmunoterapia con *T. cruzi*, es que procedimos tal cual se muestra en la Figura 16A. Animales BALB/cJ hembras de 8 semanas de edad fueron sometidos al desafío tumoral, se les practicó una cirugía de tumor primario, se inmunizaron con el extracto de *T. cruzi* y *buffer* DOC como control y se sangraron tres días después de la tercer inmunización.

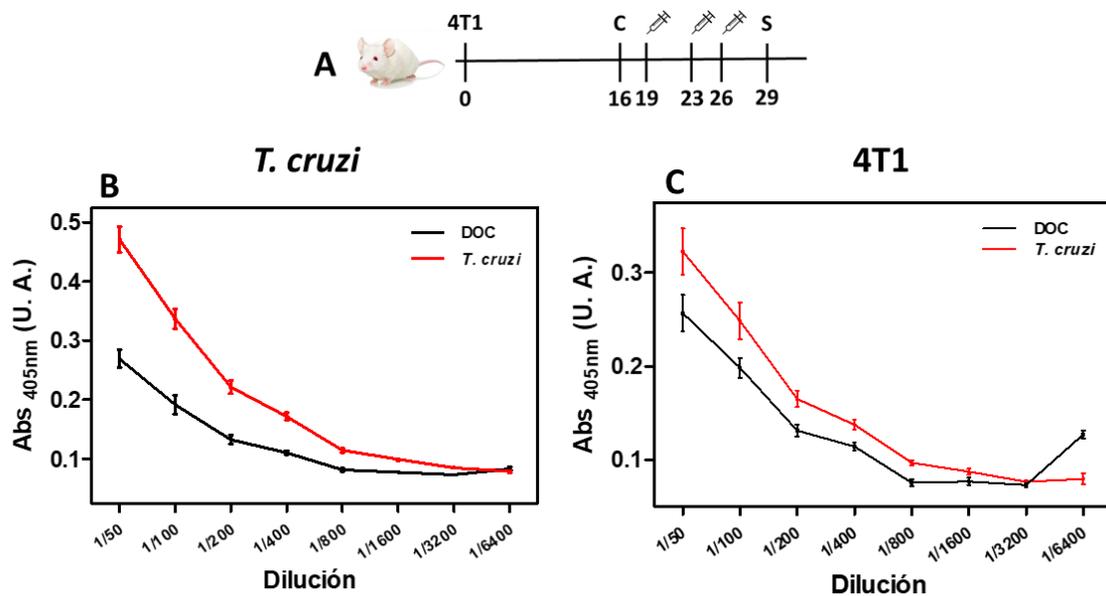


Figura 16 Evaluación *in vitro* del reconocimiento de antígenos parasitarios y tumorales por ELISA indirecto. Animales BALB/cJ fueron inyectados con 7×10^4 células 4T1, sometidos a una cirugía para remover el tumor primario, se inmunizaron con 300 μ g del extracto de *T. cruzi* y se obtuvieron los sueros (A). Se analizó por ELISA indirecto la reactividad de dichos sueros contra extractos de proteínas de *T. cruzi* (B) y células tumorales 4T1 (C).

Tal cual se observa en la Figura 16B, los sueros de ratones inmunizados con el extracto de *T. cruzi* reconocen de mejor manera al extracto que los sueros de los ratones control. Sin embargo, los valores de absorbancia alcanzados no son tan altos como en la Figura 15B. esto podría deberse a que un protocolo de inmunización más acotado en el tiempo no estaría permitiendo que se generen buenas respuestas de anticuerpos.

Para el caso del extracto de 4T1, nuevamente pareciera haber una tendencia de manera que los sueros anti-*T. cruzi* reconocen mejor al extracto, sin que las diferencias con los sueros de los ratones control sean muy marcadas (Figura 16C). Es importante recordar que la línea celular tumoral 4T1 se caracteriza por ser una línea poco inmunogénica, de manera que no esperábamos que se generaran anticuerpos anti-4T1 en ratones sometidos al desafío tumoral y no tratados con el extracto de *T. cruzi*.

4.7 Ensayo clonogénico

Con el objetivo de cuantificar las células metastásicas pulmonares se realizó un ensayo clonogénico a partir de cultivos primarios de pulmones de ratones con metástasis habiendo sido tratados con el extracto de *T. cruzi* o con *buffer* DOC como control. Brevemente, los animales fueron eutanasiados por asfixia con CO₂ el día 29 post-inyección de células tumorales (Figura 17A). El árbol bronquial fue transferido a una placa con medio de cultivo (DMEM 10% SFB, 1% Piruvato, 1% Glutamina) y los cinco lóbulos pulmonares fueron cortados en trozos de 2 x 2 mm. Se incubaron dichos trozos en una solución de Colagenasa D (Roche) 2 mg/mL por 1 h en estufa a 37°C en un atmósfera de 5% de CO₂. Pasada la hora se agregó EDTA 5 mM para cortar la reacción enzimática, se filtraron las muestras por un separador celular de 70 µm utilizando un émbolo estéril y se resuspendió la suspensión celular en un medio selectivo conteniendo 60 µM de 6-tioguanina. Se sembraron las células en diferentes diluciones y se dejaron crecer las colonias por

12 días para posteriormente teñirlas con cristal violeta por 5 min para ser contadas ($n=5$ ratones por grupo).

En la Figura 17B se observa una menor cantidad de células metastásicas en pulmones de animales inmunizados cuando se los compara con aquellos pulmones de animales no inmunizados, para dos diluciones de la suspensión celular madre diferentes. Estos resultados corresponden a animales representativos de ambos grupos y permiten concluir que la inmunización con el extracto de *T. cruzi* reduce el número de células metastásicas que logran colonizar los pulmones de los animales. Estos resultados muestran una tendencia, aunque está pendiente el refinamiento del experimento de manera de poder cuantificar las colonias celulares y así obtener resultados que permitan una comparación cuantitativa entre grupos.

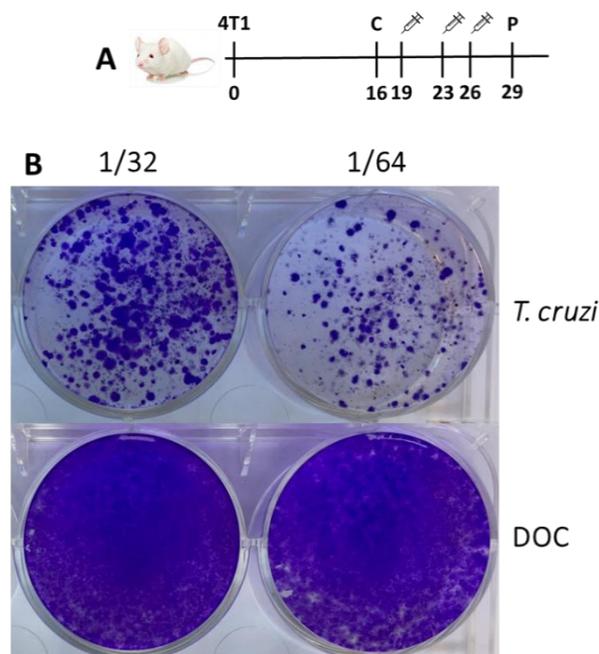


Figura 17. Ensayo clonogénico. Animales BALB/cJ fueron inyectados con 7×10^4 células 4T1, sometidos a una cirugía para remover el tumor primario, se inmunizaron con $300 \mu\text{g}$ del extracto de *T. cruzi* y se obtuvieron los pulmones (A). Se realizó un cultivo celular primario en un medio selectivo a partir de dichos pulmones. Las células 4T1 resistentes a la 6-tioguanina formaron colonias, las cuales fueron contadas luego de una tinción con cristal violeta (B).

4.8 Evaluación *in vivo* de la expresión de genes asociados a un fenotipo supresor a nivel de ganglio linfático drenante de tumor

En función de lo reportado en la bibliografía, es que nos planteamos la posibilidad de realizar un estudio de expresión de genes reguladores a nivel de los ganglios linfáticos drenantes de tumor en animales BALB/cJ sometidos al desafío tumoral con células 4T1.

Brevemente, los ganglios drenantes fueron removidos durante la cirugía tumoral a día 16 post-inyección de células 4T1. Se realizó una extracción de ARN tal cual se describe en la sección materiales y métodos y se retro-transcribió ese ARN a cDNA para realizar los estudios de expresión génica por qRT-PCR.

Como se observa en la Figura 18, se encontró expresión de los genes *Ctla4* y *Cd274* (correspondiente a PD-L1) en los ganglios de animales sometidos al desafío tumoral, ambos asociados a un fenotipo supresor. De manera interesante, los 3 animales *naive* utilizados como control no mostraron expresión alguna de dichos genes, mientras que el control interno de expresión amplificó según lo esperado.

Consecuentemente, podemos afirmar que los tumores 4T1 inducen la aparición de poblaciones reguladoras que podrían estar limitando las respuestas terapéuticas asociadas a nuestra estrategia de inmunoterapia anti-tumoral. Es necesario aclarar que estos experimentos están todavía siendo puestos a punto y que aún restan por analizar varios genes de interés inmunológico.

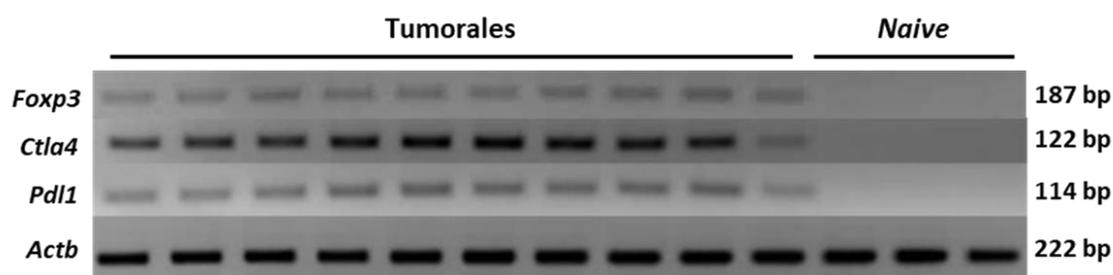


Figura 18. Estudio de expresión génica por qRT-PCR. 10 animales BALB/cJ fueron inyectados con 7×10^4 células 4T1 y sometidos a una cirugía a día 16 para remover el tumor primario y el ganglio linfático drenante de tumor. Se procesaron dichos ganglios para la extracción del ARN, retro-transcripción a cDNA y análisis de la expresión de *Foxp3*, *Ctla4* y *Cd274* (PD-L1) por qRT-PCR. *Actb* fue utilizado como gen de referencia. 3 animales *naive* fueron utilizados como control.

4.9 Evaluación del reconocimiento de antígenos tumorales por parte del suero de conejo anti-*T. cruzi* en un panel de tejidos mamarios normales y malignos humanos

Los resultados obtenidos en el modelo animal nos llevaron a preguntarnos si el reconocimiento de las estructuras antigénicas por parte del suero de conejo anti *T. cruzi* también sería un fenómeno apreciable en muestras de tumores mamarios humanos.

Para ello, realizamos ensayos de IHQ con el suero de conejo anti-*T. cruzi* en una dilución 1/100 sobre un panel de 47 muestras de carcinomas ductales invasivos y carcinomas lobulares invasivos con sus correspondientes metástasis a nivel del ganglio linfático drenante. La Figura 19 muestra imágenes representativas de aquellas muestras de tumores primarios (19A y 19B) y de las respectivas metástasis ganglionares (19C y 19D) que resultaron intensamente marcadas, con patrones citoplasmáticos difusos. De manera interesante, y como veníamos observando en otros preparados, el suero anti-*T. cruzi* no reconoce el estroma celular (Figura 19A y 19B) ni el tejido linfático normal (Figura 19C y 19D). 22/47 (47%) muestras de tumores primarios resultaron ser positivas, al tiempo que 24/47 (51%) de las metástasis lo fueron.

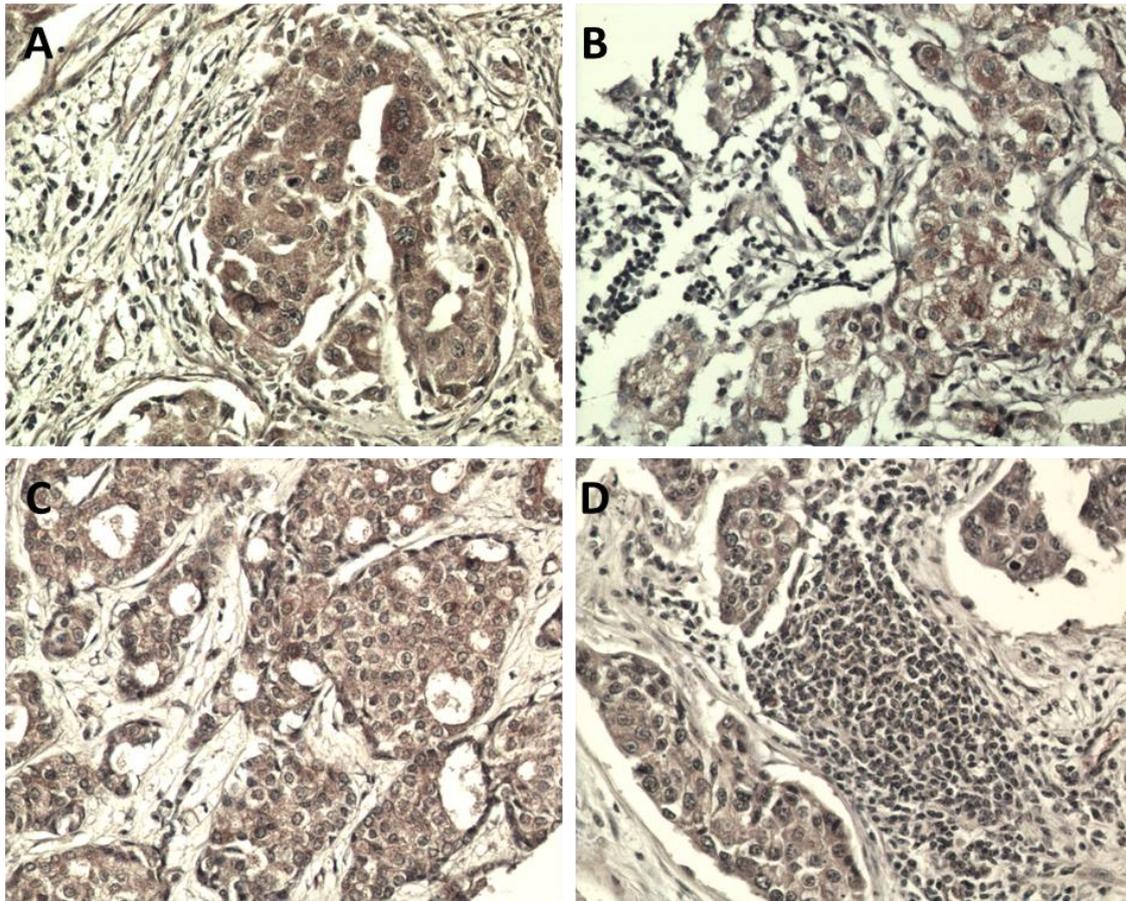


Figura 19. Evaluación *in vitro* del reconocimiento del suero de conejo anti-*T. cruzi* de antígenos de cáncer de mama humano por IHQ. Se muestra la comparación en el inmunomarcado a un aumento 100X sobre entre dos muestras representativas de tumores de mama humanos (A, B) y sus correspondientes metástasis en ganglio linfático drenante (C, D).

La relación entre la inmunotinción y los parámetros clínico-patológicos se muestra en la Figura 20. En primer lugar, se buscó correlacionar la intensidad del marcado en función del tipo de muestra, esto es, si correspondía a un tumor primario o a una metástasis. La media del *score* para los tumores primarios fue de $45,85 \pm 78,29$ y para las metástasis de $53,94 \pm 78,48$, siendo estas diferencias no significativas (Figura 20A). Cuando evaluamos qué sucedía con el *score* entre muestras tumorales y metastásicas de una misma paciente, nos encontramos con que existían muestras cuyo valor de *score* aumentaba en la comparación tumor primario-metástasis, y otras en las que disminuía (Figura 20B), sin poder registrar ninguna tendencia o comportamiento a resaltar. Al analizar el valor de *score* en

función del estadio del tumor primario, obtuvimos valores de media de *score* de $57,11 \pm 99,04$ para tumores estadio II y $39,63 \pm 61,97$ para tumores estadio III (Figura 20C). Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Cabe señalar que no se justificaba el cálculo para tumores estadio I ya que contábamos solamente con una muestra en esta categoría.

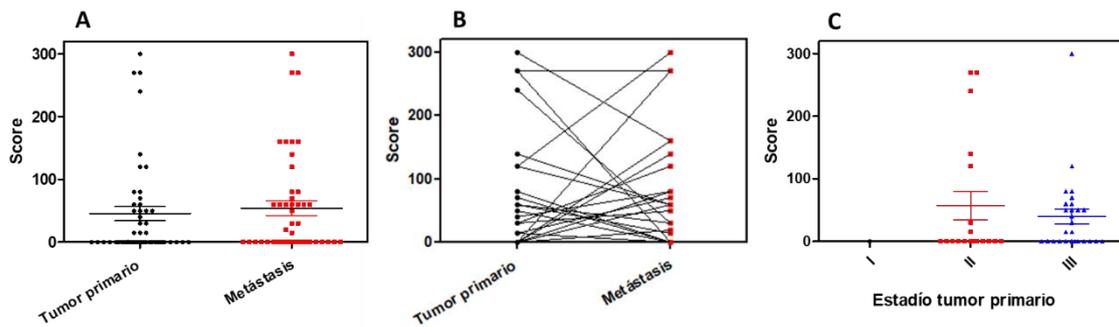


Figura 20. Expresión gráfica de los resultados obtenidos para el panel de muestras de carcinomas mamarios. Se muestran los valores de *score* obtenidos para cada una de las muestras de carcinomas mamarios y sus correspondientes metástasis en ganglio linfático drenante. Se compararon los valores de *score* entre los tumores primarios y las metástasis (A y B) y entre los distintos estadios de tumores primarios (C).

4.10 Evaluación de otros tipos de tumores humanos

Habiendo evaluado la reactividad cruzada *T. cruzi* – cáncer en un modelo tumoral murino de cáncer de mama y en un panel de tumores mamarios humanos, nos preguntamos si lo observado a nivel de reconocimiento de estructuras antigénicas sería extrapolable a otros tipos de tumores.

Para ello analizamos por ensayos de IHQ la reactividad del suero de conejo anti-*T. cruzi* en una dilución 1/150 contra 400 casos correspondientes a tejidos tumorales de 20 órganos diferentes, y 100 casos correspondiendo a los tejidos normales de dichos órganos. A su vez, y para aumentar el número tejidos normales a evaluar, analizamos un panel de 102 casos correspondientes a 35 tipos diferentes de tejidos normales, con el mismo suero a la misma dilución.

Los resultados más relevantes se muestran en la Tabla 1. En la Figura 21 se puede ver el porcentaje de muestras positivas para los tejidos en donde se encontraron las diferencias más marcadas, los cuales constituyen modelos interesantes en los que evaluar la inmunoterapia con *T. cruzi*. Entre ellos se destacan el cáncer de colon, con 13/16 (81%) muestras tumorales positivas y sólo 1/9 (11%) muestras normales positivas, al cual nos referiremos más adelante en esta sección; el cáncer de vejiga, con 13/15 (87%) muestras tumorales positivas y 0/4 (0%) de muestras normales positivas (Figura 22); el cáncer de mama, previamente evaluado; y el cáncer de cerebro, con 14/18 (78%) muestras tumorales positivas y 0/11 (0%) muestras normales positivas (Figura 23).

Con respecto a lo observado para el cáncer de vejiga, en la Figura 22 podemos ver un claro marcado de células tumorales (Figura 22A-D), manteniéndose el patrón citoplasmático difuso registrado hasta el momento en todas las muestras de reactividad positiva. La Figura 22D es la que tal vez represente de mejor manera la alta especificidad de estos anticuerpos anti-*T. cruzi* por las células tumorales, en tanto el estroma celular y otras poblaciones celulares no se marcan, constituyendo un buen control interno. Cabe destacar la reactividad negativa de las células epiteliales frente a los anticuerpos anti-*T. cruzi*, en todas las muestras de vejigas normales estudiadas (Figura 22E y 22F). Para estas muestras sí observamos un marcado intenso a nivel de musculatura vascular y fibras musculares esqueléticas, patrón repetido a lo largo de los diferentes estudios en diversos tipos de tejidos.

Para el caso del cáncer de cerebro podemos observar en la Figura 23 la intensa reactividad del suero anti-*T. cruzi* frente a muestras de astrocitoma (Figura 23A y 23B) y glioblastoma (Figura 23C y 23D). Tejidos normales de cerebro (Figura 23E) y cerebelo (Figura 23F) no mostraron reactividad anti-*T. cruzi*.

Tabla 1. Expresión gráfica de los resultados obtenidos por IHQ para los *arrays* de muestras tumorales y normales. Se muestran los resultados obtenidos mediante ensayos de IHQ con el suero de conejo anti-*T. cruzi* para los diferentes *arrays* de tejidos tumorales y normales humanos.

Tejido	Tumoral (%)	Normal (%)
Digestivo		
Esófago	11/16 (69)	2/5 (40)
Estómago	5/17 (29)	4/8 (50)
Colon	13/16 (81)	1/9 (11)
Páncreas	11/17 (65)	4/5 (80)
Hígado	11/16 (69)	8/8 (100)
Urológico		
Vejiga	13/15 (87)	0/4 (0)
Riñón	12/16 (75)	4/6 (67)
Próstata	6/20 (30)	5/8 (63)
Testículo	4/15 (27)	5/7 (71)
Ginecológico		
Mama	8/17 (47)	1/7 (14)
Cuello de útero	11/17 (65)	3/7 (43)
Ovario	4/18 (22)	3/5 (60)
Endometrio	11/14 (79)	4/4 (100)
Pulmón	16/18 (89)	2/3 (67)
Cerebro	14/18 (78)	0/11 (0)
Tiroides	15/19 (79)	3/7 (43)
Melanoma	12/15 (80)	5/5 (100)
Linfoma	4/19 (21)	0/5 (0)

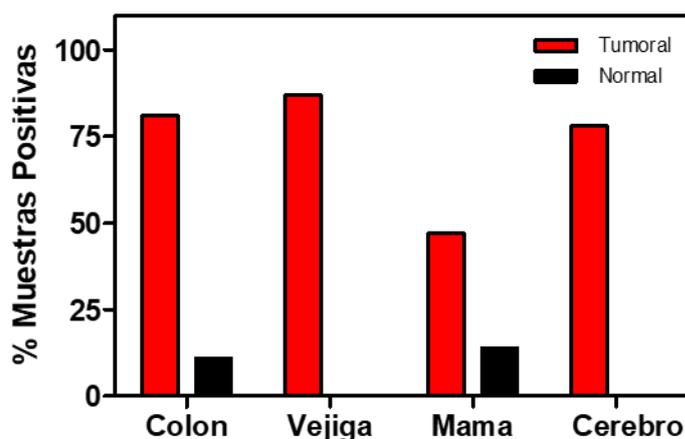


Figura 21. Se observa el porcentaje de muestras positivas para los tejidos en donde se encontraron por análisis de IHQ las diferencias más marcadas en la inmunotinción con el suero de conejo anti-*T. cruzi*.

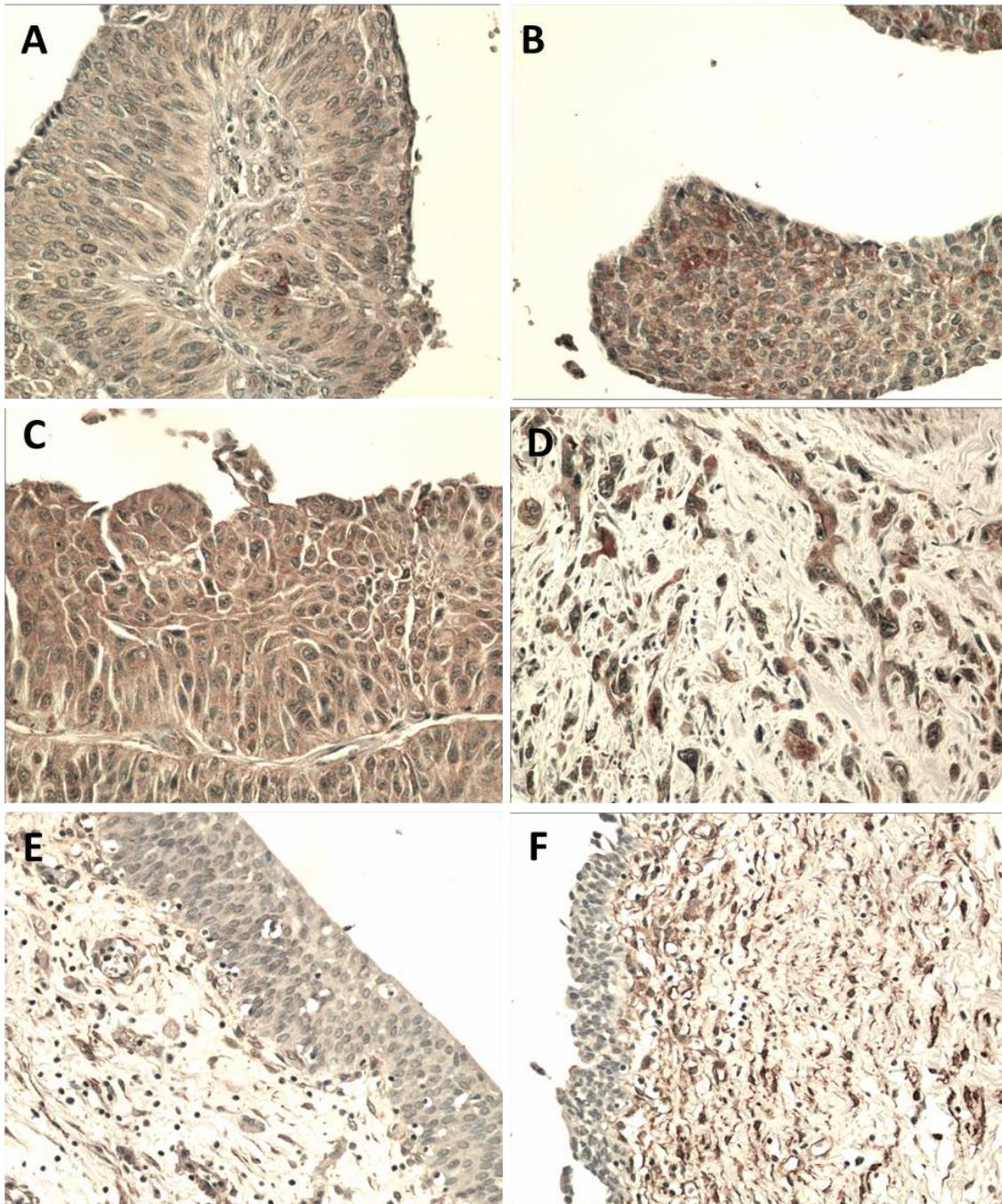


Figura 22. Evaluación *in vitro* del reconocimiento del suero de conejo anti-*T. cruzi* de antígenos de cáncer de vejiga humano por IHQ. Se muestra la comparación en el inmunomarcado a un aumento 100X entre cuatro muestras representativas de tumores de vejiga humanos (A, B, C y D) y dos muestras representativas de vejigas normales (E y F).

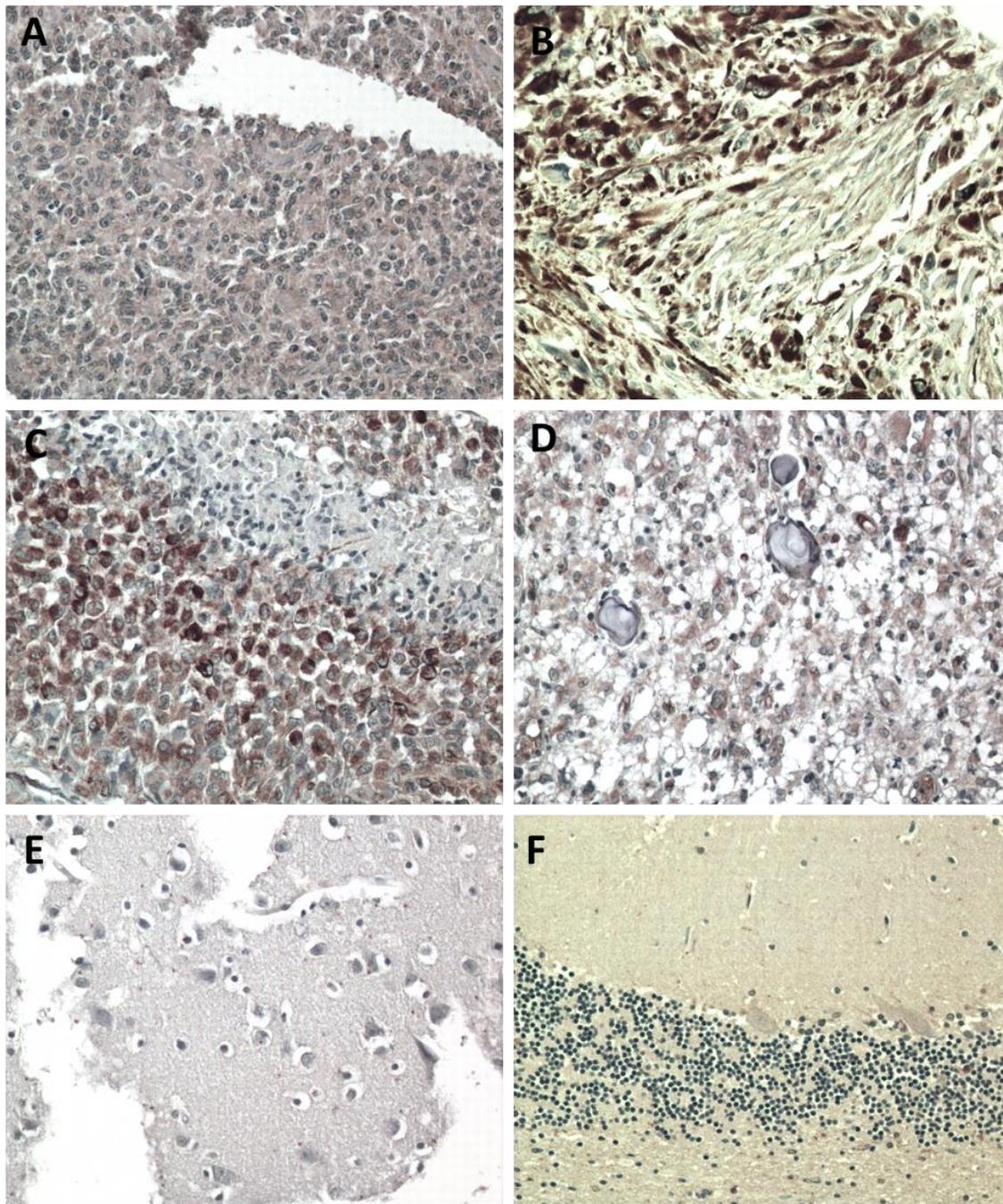


Figura 23. Evaluación *in vitro* del reconocimiento del suero de conejo anti-*T. cruzi* de antígenos de cáncer de cerebro humano por IHQ. Se muestra la comparación en el inmunomarcado a un aumento 100X entre cuatro muestras representativas de tumores de cerebro humanos: dos astrocitomas (A y B) y dos glioblastomas (C y D) y dos muestras representativas de cerebro normal (E) y cerebelo normal (F).

4.11 Evaluación en cáncer colorrectal humano

Considerando los interesantes resultados obtenidos para las muestras de colon, y considerando que el cáncer colorrectal ocupa el tercer lugar en incidencia y el cuarto lugar en mortalidad a nivel mundial, nos pareció interesante estudiar si el marcado de células tumorales con los anticuerpos anti-*T. cruzi* tenía alguna correlación con la evolución clínica de los pacientes.

Para ello, se realizaron ensayos de IHQ sobre 87 muestras de pacientes con cáncer de colon estadios I-IV con seguimiento clínico, y sus correspondientes tejidos normales adyacentes. Se utilizó un suero de conejo anti-*T. cruzi* en una dilución 1/150. De manera concordante a lo obtenido para las muestras anteriores, en estos 87 casos resultaron positivos 78/87 (90%) de los adenocarcinomas de colon y 12/87 (14%) de los tejidos normales adyacentes.

En la Figura 24 se pueden observar tres pacientes representativos de los marcados obtenidos para las muestras tumorales (A, C y E) y sus correspondientes tejidos normales adyacentes (B, D y F). De manera interesante, los anticuerpos anti-*T. cruzi* marcan de manera específica células tumorales, sin lograr reconocer estructuras presentes sobre células epiteliales de tejido normal de colon.

Previo al estudio del inmunomarcado y de manera de validar los datos clínicos del *array*, se analizó la sobrevida global de los pacientes en función del estadio tumoral (Figura 25A), obteniéndose resultados coherentes con lo observado en la clínica para esta enfermedad. Además, se analizó la sobrevida global de dichos pacientes, estratificándolos en función del *score* para el inmunomarcado (0, 1, 2 o 3) sin que se observaran diferencias significativas (Figura 25B).

Tratándose de un *array* de múltiples pacientes con seguimiento clínico, existe una gran cantidad de datos aún no analizados. Nos proponemos evaluar la sobrevida en función del *score* para el inmunomarcado en base 300, intentando determinar un valor de *cut-off* que nos permita encontrar diferencias entre los grupos.

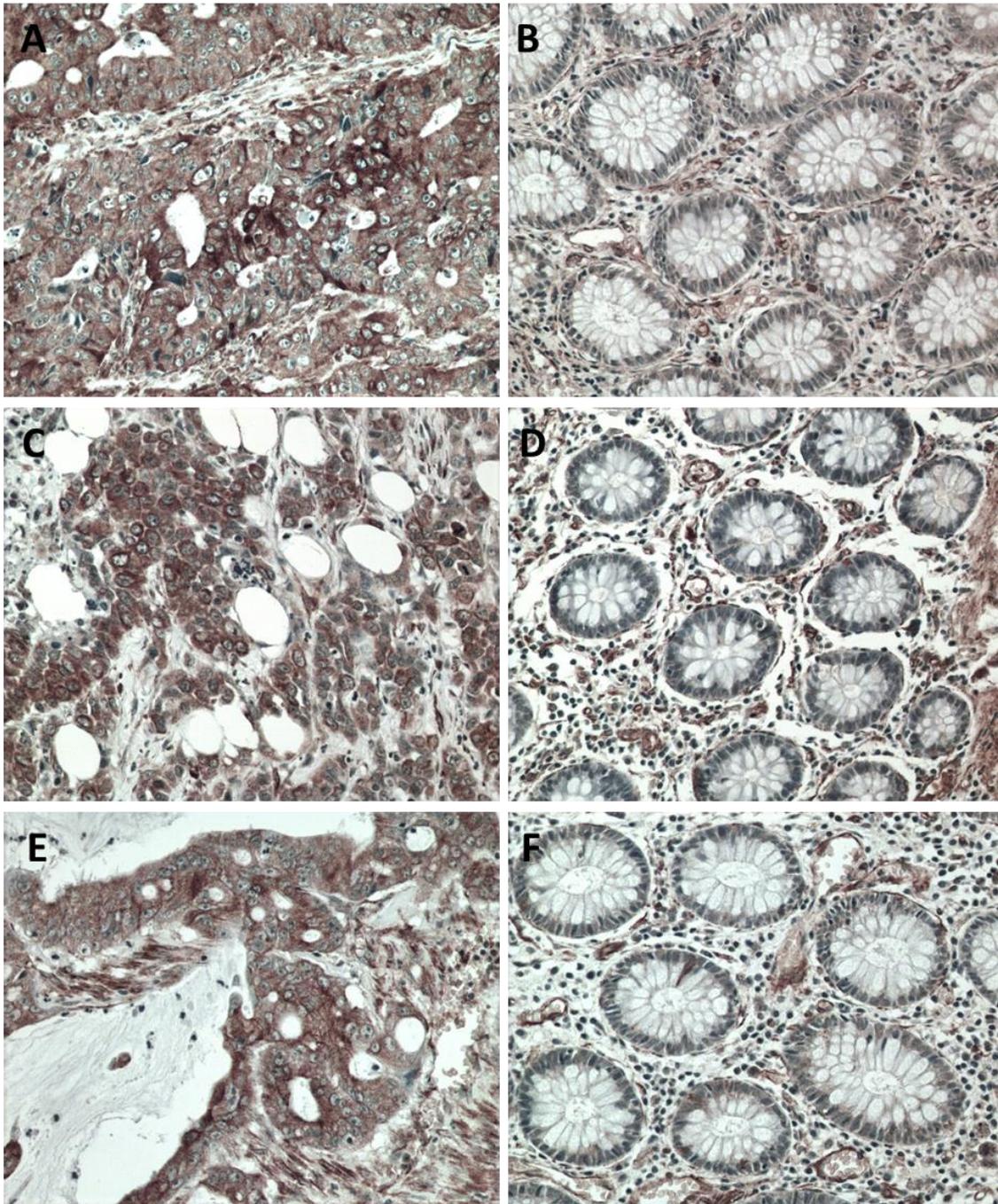


Figura 24. Evaluación *in vitro* del reconocimiento del suero de conejo anti-*T. cruzi* de antígenos de cáncer de mama humano por IHQ. Se muestra la comparación en el inmunomarcado a un aumento 100X sobre entre dos muestras representativas de tumores de mama humanos (A, B) y sus correspondientes metástasis en ganglio linfático drenante (C, D).

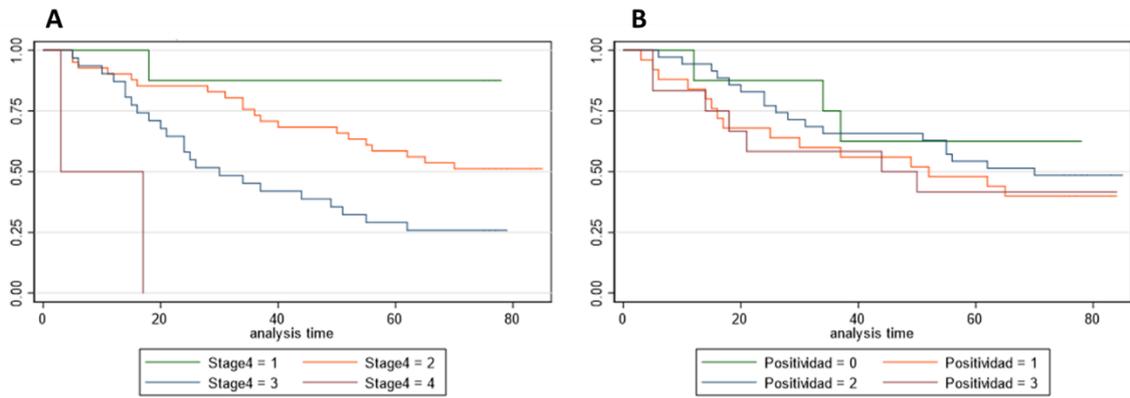


Figura 25. Estudio de datos clínicos correspondientes a muestras de pacientes con cáncer de colon. Se muestran los Kaplan-Meier evaluando la sobrevida global de pacientes con cáncer colorrectal en función del estadio tumoral (A) y del *score* para el inmunomarcado con el suero de conejo anti-*T. cruzi* (B).

5. DISCUSIÓN

La caracterización molecular de diferentes tumores humanos ha demostrado la heterogeneidad y la complejidad de los mismos y la diversidad entre los tumores de diferentes pacientes. Es por esto que se acepta que un enfoque más personalizado del tratamiento anti-tumoral puede maximizar el beneficio para el paciente. Los tratamientos están evolucionando permanentemente; han pasado de estar basados en características histológicas a considerar aspectos moleculares como ser el perfil mutacional de un tumor específico (Butterfield, 2015).

Si analizamos el abanico de opciones terapéuticas actuales en lo que refiere al tratamiento del cáncer, y dejando de lado la cirugía por tratarse del abordaje de primera línea para la gran mayoría de los tumores primarios, claramente podemos establecer tres grandes grupos de tratamientos: el de los compuestos citotóxicos clásicos, las nuevas terapias dirigidas basadas en pequeñas moléculas con función inhibitoria y las inmunoterapias emergentes. Todos estos grupos han registrado grandes avances en los últimos años, siendo tal vez el de las inmunoterapias anti-tumorales el grupo de mayor crecimiento y potencial terapéutico. Este impacto clínico comenzó a partir del año 2010, con la aprobación por parte de la *Food and Drug Administration* (FDA por sus siglas en inglés) del agente inmuno-terapéutico Sipuleucel-T (Provenge™) para el cáncer de próstata metastásico resistente a la castración y el inhibidor del punto de control inmunológico Ipilimumab (Yervoy®) para el melanoma avanzado (Martin-Liberal *et al*, 2017). Desafortunadamente, son varias las limitaciones con este tipo de terapias, incluida una heterogeneidad de respuestas en donde algunos pacientes logran una respuesta completa pero otros no responden. Además, pueden haber recaídas debido a mecanismos de inmuno-escape tumoral alternativos, y faltan biomarcadores óptimos que predigan el tipo de respuesta y la eventual toxicidad. Otros problemas importantes han sido la aparición de

nuevos efectos adversos y reacciones similares a las observadas en la autoinmunidad, sin mencionar el elevado costo asociado a estas terapias (Marin-Acevedo *et al*, 2018).

Diferente es la situación para otras opciones de abordajes terapéuticos, como es el caso de las vacunas contra el cáncer, las cuales han tenido poco éxito, y los resultados alcanzados a nivel de laboratorio en modelos preclínicos no se han podido reproducir en los ensayos clínicos en humanos. La vacunación contra el cáncer está diseñada para promover la inmunidad anti-tumoral. Una cantidad sustancial de datos de diferentes modelos animales respalda la importancia central de los linfocitos T CD8⁺ con capacidad citotóxica en la inmunidad anti-tumoral efectiva de manera de promover la lisis de las células tumorales. Muchas vacunas contra el cáncer están diseñadas para activar dichos CTLs utilizando diversas formas de antígenos que incluyen epítopos de péptidos restringidos por MHC, péptidos largos, proteínas y ADNc (Butterfield, 2015). Los antígenos tumorales contra los que se dirigen estas vacunas se formulan con diversos adyuvantes y se administran como péptidos, proteínas, ADN, vectores virales recombinantes y células autólogas o alogénicas (Butterfield, 2016).

Varios ensayos clínicos con vacunas contra el cáncer han demostrado importantes regresiones tumorales; pero en una minoría de pacientes (5-10%), y algunos grandes ensayos clínicos han mostrado tendencias significativas con mejores resultados para pacientes en donde la vacunación fue exitosa. Sin embargo, también se han realizado muchos estudios que arrojaron resultados negativos con inmunogenicidad mínima y sin evidencia de eficacia terapéutica. Hasta la fecha, no hay biomarcadores de una vacuna exitosa que pueda generar una respuesta inmune anti-tumoral potente. Todavía no hay biomarcadores para pacientes que responderán inmunológica o clínicamente, ni para el tipo exacto de respuesta inmune necesaria para provocar una respuesta clínica significativa. El campo continúa avanzando lentamente, probando diferentes estrategias de vacunas y, más recientemente, combinaciones con otros tipos de terapias (por

ejemplo, células alogénicas modificadas genéticamente y bacterias recombinantes) y con inhibidores de punto de control inmunológico recientemente aprobados para su uso en la clínica (Butterfield, 2016). Es así que todavía hay mucho por entender acerca del papel que podrían llegar a cumplir las vacunas anti-cáncer en la terapia anti-tumoral.

A continuación, discutiremos los resultados obtenidos separándolos en los cuatro objetivos específicos de esta tesis.

En primer lugar, y en función de los resultados observados en la Figura 6, podemos afirmar que el extracto de *T. cruzi* no parecería tener un efecto citotóxico directo sobre células tumorales de la línea 4T1, en tanto los valores de IC₅₀ para el extracto de *T. cruzi* y el control con *buffer* DOC, obtenidos a partir de las curvas del porcentaje de viabilidad celular en función del logaritmo de la concentración del extracto, no muestran diferencias significativas.

Sí podemos observar una diferencia en los valores más bajos de concentración del extracto de *T. cruzi* para la condición de 48 h. Incluso sorprende que para una concentración de extracto de 0,025 µg/µL el porcentaje de viabilidad celular sea de 74,8%, cuando para las condiciones de 24 y 72 h fue cercano al 100%. Esto se lo podemos atribuir a posibles inconvenientes técnicos durante la realización del experimento; podría ser que la cantidad inicial de células sembradas en el pocillo fuese menor a las del resto de las condiciones o que algunas células tumorales se hayan despegado del fondo de los pocillos durante la manipulación, de manera que la cantidad de partida al momento de la incubación con el MTT fuera menor a la del pocillo control.

5.1 Evaluación del potencial terapéutico de un extracto de *Trypanosoma cruzi* en un modelo animal de cáncer de mama metastásico.

Con respecto al potencial terapéutico del extracto de *T. cruzi*, y cómo se desprende de los resultados observados en la Figura 7 en el modelo animal 4T1, la inmunización con diferentes dosis de extractos proteicos del parásito no parece tener efectos terapéuticos cuando se evalúa el crecimiento tumoral y la supervivencia global de los animales. A diferencia de ensayos anteriores de nuestro grupo en donde la inmunización con *T. cruzi* sí mostraba tener efectos profilácticos y terapéuticos (Monin, Tesis de Maestría, PEDECIBA Biología, 2011; Ubillos *et al*, 2016; Freire *et al*, manuscrito en preparación), parecería ser que en un modelo tan agresivo y metastásico como es el modelo 4T1 no conseguimos observar dichas respuestas.

Analizando la Figura 8, parecería ser necesaria la remoción del tumor primario para poder observar una respuesta objetiva (Figura 8C), siempre y cuando el inóculo inicial de células tumorales no sea demasiado grande, ya que para una administración inicial de 5×10^5 células 4T1, incluso con cirugía del tumor primario, no se observan respuestas terapéuticas luego de la inmunización con *T. cruzi* (Figura 8B). Esto último coincide con lo observado en los experimentos de Kramer *et al*, en donde independientemente del tratamiento y el protocolo de inmunizaciones, los animales sometidos al desafío tumoral no lograban un efecto terapéutico si no se realizaba la remoción del tumor primario (Kramer *et al*, 2015). A su vez, va en línea con lo recientemente revisado por Headon *et al*, en donde estudios previos recientes sugieren que la resección tumoral primaria en pacientes humanos puede ser un factor independiente para mejorar la supervivencia y, además, controlar los síntomas locales (Headon *et al*, 2016). Incluso se ha sugerido que la resección del tumor primario en la enfermedad en estadio IV ayuda a la supervivencia al reducir la carga tumoral, específicamente,

al reducir el número de células tumorales circulantes, capaces de originar metástasis a distancia (Budd *et al*, 2006).

La evidencia acumulada indica que la aparición de tumores metastásicos, la principal causa de letalidad en la clínica, está relacionada con el fenotipo agresivo de una pequeña fracción de células cancerosas llamadas células madre tumorales o células iniciadoras de tumores. Se ha demostrado que las células madre en el cáncer de mama exhiben capacidades de crecimiento únicas que incluyen auto-renovación, potencial de diferenciación y resistencia a la mayoría de los agentes anti-tumorales, incluida la quimioterapia y/o la radioterapia, todo lo cual contribuye al desarrollo y a la agresividad de las lesiones metastásicas recurrentes (Geng *et al*, 2014). La remoción quirúrgica del tumor primario ayudaría a disminuir de manera considerable la carga de esta sub-población celular. Además, en función de distintas evidencias experimentales se ha postulado un modelo en el que las células metastásicas pueden circular de vuelta al tumor primario para "re-implantarse", acelerando de esta forma el crecimiento tumoral y la angiogénesis a través de la acción de diferentes citoquinas (Kim *et al*, 2009).

En muchos casos, la propia remoción del tumor primario representa la cura del cáncer. Nuestro modelo, para el cual sabemos que al día de la cirugía tumoral ya existen células metastásicas diseminadas, nos coloca en el escenario de una eventual recurrencia post-quirúrgica. Un dato interesante observado en la Figura 8C es que la población de animales cuya sobrevivencia se ve aumentada gracias al tratamiento con *T. cruzi*, logra rechazar la re-inoculación a día 70 de 7×10^4 células tumorales 4T1. Esto da cuenta de un estado de memoria inmunológica adquirido luego de la inmunización que permite el rechazo de dichas células tumorales y que puede ser el responsable de la eliminación de metástasis tumorales, logrando así una cura clínica, ya que dichos animales aún siguen vivos luego de 1 año y no han vuelto a desarrollar tumores. A su vez, esta situación representa uno de los principales objetivos que se busca con una vacuna anti-tumoral.

En el caso del cáncer, la eliminación completa del tumor, es un requisito previo para alcanzar la memoria inmunológica. Sin embargo, este requisito es necesario pero no suficiente, ya que la extirpación quirúrgica de todo tumor visible a menudo es insuficiente para lograr la memoria y la curación a largo plazo. Estudios recientes sugieren que la resección tumoral después de la activación inmune puede conducir a niveles más altos de memoria inmunológica contra otros antígenos tumorales, en forma de metástasis. Una posible explicación radica en la eventual importancia que podría llegar a tener el uso de un adyuvante eficaz en la formulación de la vacuna anti-tumoral para inducir esa activación inmune (Tsung & Norton, 2016).

Durante el curso de una infección natural, los microorganismos invasores alertan al sistema inmune innato del huésped con sustancias específicas conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMPs por sus siglas en inglés). Estas sustancias inducen la producción de citoquinas específicas que actúan como moléculas inmuno-moduladoras y alertan a la inmunidad adaptativa de que los antígenos activadores son "extraños" y deben eliminarse. Dichas citoquinas actúan al unirse a receptores ubicados en la membrana celular de células del sistema inmune y las guían para responder a los antígenos de manera específica. Entre las principales citoquinas producidas por la inmunidad innata en respuesta a diferentes PAMPs se encuentra la IL-12, encargada de generar una respuesta de células T de perfil T_H1 , con una fuerte activación de linfocitos T $CD8^+$ con función citotóxica. Varios estudios han demostrado el beneficio de la formulación de vacunas anti-tumorales conteniendo IL-12. Por ejemplo, se ha visto que la pérdida de respuesta antitumoral durante ciclos múltiples de quimioterapia se asocia con una falta de activación inmunitaria y no con una resistencia intrínseca a fármacos por parte de las células tumorales. Más importante aún, se vio que la adición de IL-12 a un tratamiento basado en ciclos de quimioterapia mantiene, e incluso aumenta, la respuesta inmune anti-tumoral en diferentes tumores murinos,

tanto inmunogénicos como no inmunogénicos, y prolonga significativamente la supervivencia de los animales (Zhang *et al*, 2015).

Como mencionamos anteriormente, varios ensayos preclínicos y clínicos han investigado una variedad de vacunas anti-tumorales, formuladas a partir de antígenos purificados, péptidos inmunodominantes, ADN codificante de antígenos asociados a tumor (*Tumor-Associated Antigens*, TAAs por sus siglas en inglés) o antígenos específicos de tumor (*Tumor-Specific Antigens*, TSAs por sus siglas en inglés), virus recombinantes que codifican antígenos tumorales y células tumorales enteras, como candidatos en la inmunoterapia del cáncer. Las células tumorales enteras generalmente expresan todos los TSAs y TAAs relevantes, incluidos aquellos identificados como potenciales activadores simultáneos de células T CD8⁺ y CD4⁺, y pueden estimular respuestas inmunes específicas (Sheikhi *et al*, 2016). Sin embargo, la mayoría de los tumores no son fuertemente inmunogénicos debido al proceso de inmuno-edición tumoral, un proceso que permite que las células tumorales evolucionen y editen su inmunogenicidad durante las interacciones continuas con el sistema inmune del hospedero. Por lo tanto, mejorar la inmunogenicidad de las células tumorales es muy importante y podría resultar en un beneficio clínico (Al-Tameemi *et al*, 2012). Varios estudios han propuesto el uso de células tumorales genéticamente modificadas, que expresan moléculas coestimuladoras o secretan citoquinas activadoras, para mejorar la inmunogenicidad tumoral e inducir así respuestas inmunitarias antitumorales, entre ellas la IL-12. Con esto en mente, es importante volver a destacar los resultados obtenidos por Kramer *et al* en el modelo animal 4T1, para el cual se alcanzaron porcentajes de supervivencia del 90% luego de 200 días de inyectadas las células tumorales al administrar por vía intra-tumoral una combinación de vectores virales expresando IL-12 y una cepa atenuada de *Salmonella* en un protocolo de neoadyuvancia (Kramer *et al*, 2015).

Para el caso de nuestros experimentos, es importante destacar que nuestras vacunas están formuladas utilizando hidróxido de aluminio como adyuvante.

Sorprendentemente, el mecanismo de cómo los adyuvantes basados en hidróxido de aluminio ejercen sus efectos beneficiosos todavía no se comprende completamente. Las explicaciones actuales para su modo de acción incluyen, entre otros, el efecto repositario, según el cual las partículas de adyuvante presentan antígenos reposicionados a las células inmunitarias promoviendo así interacciones de larga duración (Kuroda *et al*, 2013); el efecto pro-fagocítico que permite un mejor procesamiento de los antígenos por parte de las células presentadoras de antígenos y la activación de la ruta pro-inflamatoria del inflamasoma NLRP3. Conjuntamente, estos efectos activan respuestas inmunes innatas y adaptativas y activan el sistema del complemento (He *et al*, 2015). A su vez, por tratarse de un extracto parasitario, muchos de los componentes de nuestra vacuna constituyen PAMPs en sí mismos, por lo que el propio extracto también podría estar actuando como adyuvante al favorecer una fuerte activación del sistema inmune innato, potenciando de esta forma la respuesta inmune anti-tumoral contra antígenos tumorales propios de las células 4T1 o de los parásitos, como discutiremos más adelante.

5.2 Estudio de la presencia de antígenos de reacción cruzada entre *Trypanosoma cruzi* y células tumorales por abordajes técnicos complementarios.

Con respecto al reconocimiento antigénico sobre extractos de células 4T1, los estudios de *Western blot* presentados en la Figura 11 muestran las diferencias que existen entre el suero de conejo anti-*T. cruzi* y un suero pre-inmune de conejo. Estas diferencias son claras cuando comparamos los patrones de bandas obtenidos en los *Western blot* a partir de las electroforesis mono-dimensionales haciendo migrar los extractos de *T. cruzi* y el extracto de células tumorales 4T1. Incluso se observan diferencias cuando comparamos el suero hiper-inmune con la fracción IgG de dicho suero, dando cuenta del eventual rol que podrían estar cumpliendo otras inmunoglobulinas, como por ejemplo las de isotipo IgM, en el reconocimiento de estructuras antigénicas.

Hemos obtenido resultados similares a los observados en la Figura 11 luego del análisis de otras líneas celulares, tanto de origen murino como de origen humano. En la Figura 26 se observan los *Western blots* a partir de electroforesis mono-dimensionales para diferentes líneas celulares tumorales. LL/2 corresponde a una línea celular tumoral murina de un carcinoma de pulmón de Lewis, CT26.WT corresponde a una línea celular tumoral murina de un adenocarcinoma de colon y SW480 y SW620 corresponden a líneas celulares tumorales humanas de un adenocarcinoma de colon y la metástasis ganglionar de dicho tumor primario, respectivamente. A su vez, se migraron además extractos de proteínas de tejidos de colon normal, para comparar con la línea CT26.WT, y de pulmón normal, para comparar con la línea LL/2. Nuevamente observamos diferencias en los patrones de bandas cuando comparamos el suero de conejo anti-*T. cruzi*, la fracción IgG de dicho suero, y el suero pre-inmune. Las diferencias más claras aparecen señaladas en la Figura 21 con flechas rojas. No solo es interesante la comparación entre el marcado para el suero hiper-inmune y el suero pre-inmune, el cual nos estaría

hablando de anticuerpos generados durante la inmunización capaces de reconocer antígenos tumorales, sino también la comparación entre el suero hiper-inmune y la fracción IgG de dicho suero, donde una vez más las diferencias podrían estar dando cuenta de antígenos que estén siendo reconocidos por inmunoglobulinas de isotipo IgM.

Entre esas estructuras tumorales antigénicas reconocidas por inmunoglobulinas de isotipo IgM, podrían estar ciertos motivos carbohidratos. La glicosilación aberrante en el cáncer se describió por primera vez hace más de 45 años (Meezan *et al*, 1969), y desde entonces se ha documentado que durante la transformación maligna y la progresión tumoral, ocurren cambios fundamentales en los patrones de glicosilación de la superficie celular y las glicoproteínas secretadas. La correlación existente de la glicosilación con la iniciación, la progresión y la metástasis del tumor, transforma a la glicobiología tumoral en una herramienta útil para el diagnóstico precoz, la monitorización de la enfermedad y el pronóstico, así como también provee una nueva fuente de blancos terapéuticos.

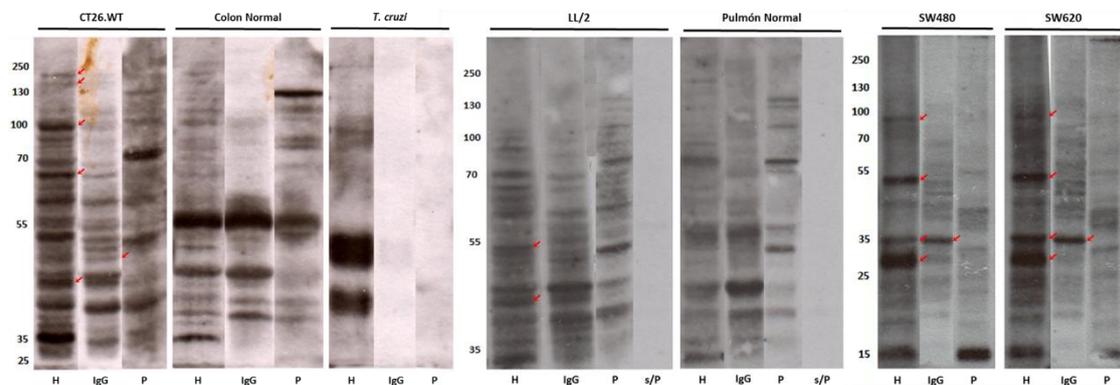


Figura 26. Evaluación *in vitro* del reconocimiento de antígenos tumorales por Western blot para diferentes líneas celulares. Se muestra el reconocimiento antigénico por parte de un suero de conejo anti-*T. cruzi* (H), la fracción IgG de dicho suero (IgG) y un suero pre-inmune de conejo (P) sobre extractos de proteínas de las líneas celulares CT26.WT, LL/2, SW480, SW620, sobre extractos proteicos de tejidos de colon y pulmón de ratones y sobre un extracto de proteínas de *T. cruzi* (TC).

La expresión de glicanos asociados al cáncer, denominados antígenos carbohidratos asociados a tumor (*Tumor-Associated Carbohydrate Antigens*,

TACAs por sus siglas en inglés), como ser los antígenos sialil-LewisX (SLe^x), el antígeno Thomsen-nouvelle (Tn) y el antígeno sialil-Tn (sTn), entre otros, se ha registrado en diversos tipos de cáncer (Häuselmann & Borsig, 2014) y su presencia respondería a alteraciones en diferentes glicosiltransferasas. Por ejemplo, SLe^x sirve como ligando para la molécula de adhesión celular selectina, que participa en la adhesión de las células cancerosas al endotelio vascular y, por lo tanto, contribuye a la metástasis hematológica (Julien *et al*, 2011).

Cabe destacar que nuestro grupo ha encontrado este tipo de antígenos carbohidratos en varios tipos de parásitos. Por ejemplo, el antígeno Tn en parásitos helmintos como ser *Echinococcus granulosus*, *Mesocestoides corti*, *Fasciola hepática*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Toxocara canis* y *Taenia hydatigena* (Alvarez Errico *et al*, 2001; Casaravilla *et al*, 2003; Freire *et al*, 2003); el antígeno sTn en *T. cruzi* (Freire *et al*, 2003) y *Mesocestoides vogae* (Medeiros *et al*, 2008) y el antígeno Tk en parásitos helmintos como ser *Taenia hydatigena*, *Mesocestoides vogae* y *Taenia crassiceps* (Ubillos *et al*, 2007).

Las alteraciones en los patrones de glicosilación pueden ayudar en varias etapas de la progresión tumoral. Los mecanismos por los cuales se producen estructuras de glicanos alterados en las células cancerosas siguen siendo poco conocidos, pero se cree que están implicados cambios a nivel epigenético, mutaciones somáticas, desregulación de la expresión de los genes de glicosiltransferasas y chaperonas, y una localización incorrecta de dichas glicosiltransferasas (Potapenko *et al*, 2015; Stowell *et al*, 2015; Bard & Chia, 2016; Vojta *et al*, 2016).

Algunas de estas inmunoglobulinas de clase IgM podrían ser también anticuerpos naturales poli-reactivos de baja afinidad generados contra antígenos onco-fetales, capaces de reaccionar de manera cruzada con los antígenos tumorales. Los anticuerpos naturales son codificados en línea germinal y no atravesaron el proceso de maduración de la afinidad. Se unen preferentemente a antígenos de superficie celular modificados a nivel post-transcripcional que son específicos de

tumor, reconociendo las estructuras conservadas de los epítomos carbohidratos. Los epítomos carbohidratos que son reconocidos por las IgM naturales se expresan de manera estable en muchos tumores en varias etapas del desarrollo tumoral. A diferencia los epítomos peptídicos lineales, los glico-epítomos comparten homologías estructurales más allá de los límites de las familias de proteínas; por lo tanto, pueden reaccionar de manera cruzada y constituir los blancos preferidos para los anticuerpos naturales de isotipo IgM (Díaz-Zaragoza *et al*, 2015).

Es así que las IgM naturales se asocian con el reconocimiento y la eliminación de células tumorales. Los mecanismos por los cuales las IgM presentes en la circulación sanguínea podrían destruir a las células tumorales son la citotoxicidad dependiente del complemento o la inducción del proceso de apoptosis. Se ha postulado incluso que los anticuerpos anti-carbohidrato podrían ser parte de una respuesta inmune anti-tumoral activa y que su presencia en la sangre periférica de individuos sanos constituya el brazo humoral de una respuesta inmune anti-tumoral como parte del proceso de inmuno-vigilancia tumoral (Schwartz-Albiez, 2012).

Los abordajes terapéuticos basados en mono-terapias han mostrado no ser del todo efectivos, en tanto las células tumorales cuentan con mecanismos que les permiten acumular mutaciones, generar resistencia, desarrollar vías de evasión o de inmuno-escape tumoral, etc. La combinación de terapias vuelve a ser crucial para el objetivo de alcanzar respuestas terapéuticas en la clínica. En este sentido, un conjunto de blancos moleculares asociados con una variedad de funciones biológicas son los TACAs. De manera interesante, los TACAs, y los glicanos en general, se pueden describir como pan-antígenos ya que forman parte de la estructura de muchas proteínas y lípidos que participan de variadas vías metabólicas y procesos celulares en muchas células cancerosas. Es por esto que aprovechar la naturaleza poli-específica de los anticuerpos naturales podría generar efectos que superarían lo alcanzado por la naturaleza singular de la

terapéutica dirigida y no tendría los inconvenientes propios que suponen las mutaciones genéticas, ya que los TACAs son componentes necesarios de un gran número de proteínas y lípidos (Kieber-Emmons *et al*, 2017).

Otro aspecto a comentar con respecto al uso del *Western blot* como técnica para la identificación de estructuras antigénicas es el hecho de la sensibilidad propia de esta técnica. Cuando se evalúa el reconocimiento del suero pre-inmune con técnicas como la IFI o la IHQ, no veíamos positividad alguna que indicara el reconocimiento de antígenos por parte de los anticuerpos del suero pre-inmune. Con técnicas más sensibles como lo son la citometría de flujo, y mucho más aún con el *Western blot*, sí comienzan a aparecer motivos antigénicos que son reconocidos por dicho suero. Esto es entendible en tanto la sensibilidad de estas técnicas es mayor y no podemos descartar la reactividad cruzada entre los anticuerpos de un suero pre-inmune, donde se encontrarían muchos de los anticuerpos naturales que acabamos de mencionar, y proteínas de una línea celular tumoral dada.

Siguiendo con el análisis del reconocimiento antigénico, de los resultados obtenidos a partir del tipo de marcado observado para los ensayos de IHQ podemos confirmar una característica propia de los tumores en general, y del cáncer de mama en particular, que es la heterogeneidad intra-tumoral. Analizando las Figuras 8, 9 y 15, podemos observar que la población de células tumorales con tinción positiva para el suero de conejo anti-*T. cruzi*, responde a sub-poblaciones celulares que forman parte de un mismo tumor. Estas sub-poblaciones de células cancerosas difieren en sus características genéticas, fenotípicas o de comportamiento dentro de un tumor primario dado, y entre un tumor primario y su metástasis. Esta diversidad puede atribuirse a factores genéticos y epigenéticos, y a mecanismos no hereditarios tales como respuestas adaptativas o diferencias a nivel de vías de señalización (Marusyk *et al*, 2012).

Las teorías que describen el establecimiento y mantenimiento de la heterogeneidad intra-tumoral son la hipótesis de la existencia de células madre tumorales (Meacham & Morrison, 2013) y el modelo de evolución clonal (Greaves & Maley, 2012), dos conceptos que inicialmente se creían mutuamente excluyentes, pero ahora se perciben como potencialmente complementarios. Esta heterogeneidad intra-tumoral es la que en parte determina que determinados tratamientos logren eliminar solamente parte de la población de células tumorales, dejando un remanente de células capaces de volver a proliferar y generar las recurrencias observadas en la clínica.

5.3 Caracterización de la respuesta inmune anti-tumoral observada y evaluación de aspectos propios del modelo animal.

Con respecto a los estudios de caracterización del modelo 4T1 es importante discutir los resultados obtenidos a partir de los ensayos de expresión génica en ganglios drenantes de tumor. En función de datos de la literatura, sabíamos que las metástasis pulmonares del cáncer de mama requieren del reclutamiento y expansión de T_{regs} , de manera de promover el escape tumoral y lograr así evadir los efectos de células inmunes efectoras, como ser las células NK. El mecanismo por el cual se podría dar el reclutamiento de esta población reguladora sería independiente de MDSCs y, a partir de datos obtenidos en el modelo 4T1, se sugiere la participación de una población de células B reguladoras evocadas por tumor (tB_{regs}) cuyo principal papel en la siembra de metástasis pulmonares sería el de inducir la conversión dependiente de TGF- β , de células T CD4⁺ en reposo en células T_{regs} FoxP3⁺ (Olkhanud *et al*, 2011). Adicionalmente, se ha reportado que el modelo murino del carcinoma mamario 4T1 expresa PD-L1 *in vivo* (Hirano *et al*, 2005).

Con esto en mente, es que nos propusimos evaluar la presencia de moléculas asociadas a un fenotipo regulador a nivel del ganglio drenante de tumor en nuestro modelo animal 4T1. A partir de los experimentos de expresión de genes por qRT-PCR utilizando cDNA generado a partir de los ARNs extraídos de ganglios drenantes de tumor de ratones *naive* y ratones sometidos al desafío tumoral, es que encontramos la presencia de ARN codificante para PD-L1, FoxP3 y CTLA-4 solamente en los ganglios de animales desafiados con células 4T1 (Figura 18).

Ésta constituye una etapa de trabajo recientemente iniciada y aún estamos poniendo a punto las condiciones para ensayar otras moléculas asociadas a un fenotipo regulador. Con estos resultados sobre la mesa no nos sorprendería encontrar además la presencia de transcritos de otras citoquinas reguladoras como ser IL-10 y TGF- β .

Una pregunta que se desprende de este resultado es si nuestra estrategia de inmunoterapia anti-tumoral con extractos de *T. cruzi* podría verse beneficiada a través del uso de anticuerpos monoclonales (*Monoclonal Antibodies*, mAbs por sus siglas en inglés) inhibidores de puntos de control inmunológico como ser anticuerpos anti-CTLA-4/PD-1/PD-L1. Si consideramos que nuestra vacuna con extractos de *T. cruzi* podría estar actuando de manera de favorecer la activación de la inmunidad innata para permitir el posterior desarrollo de respuestas adaptativas de células efectoras con poder citotóxico, el hecho de tener poblaciones reguladoras tanto en el microambiente tumoral como a nivel pulmonar no permitiría alcanzar los niveles óptimos de respuestas terapéuticas. El uso de los anticuerpos mencionados permitiría eliminar dichas poblaciones o al menos privarlas de sus funciones supresoras para quitar el freno de la inmunidad anti-tumoral y permitir así la destrucción de las células 4T1.

Es importante considerar que la administración de mAbs dirigidos al eje PD-1/PD-L1 ya ha sido utilizada en el modelo animal 4T1 con resultados controversiales. Por ejemplo, la administración repetida por vía intraperitoneal de estos anticuerpos indujo reacciones de hipersensibilidad fatales luego de 4-5 administraciones, las cuales no se registraron para el caso de mAbs anti-CTLA-4. Estos eventos ocurrieron solamente en ratones portadores del tumor 4T1 altamente inflamatorio y no ocurrieron en ratones con tumores no inflamatorios. (Mall *et al*, 2016).

Una posible explicación podría estar dada por la naturaleza antigénica de dichos mAbs. Las investigaciones preclínicas utilizan principalmente mAbs xenogénicos que a menudo pueden conducir a la generación de anticuerpos de ratón anti-anticuerpo con función neutralizante capaces de provocar reacciones de hipersensibilidad. Es así que el uso de estos mAbs en modelos de investigación pre-clínica puede conducir a respuestas inmunes que causen limitaciones en la evaluación de la dosificación óptima y del tiempo y la administración de los tratamientos, constituyendo de esta forma modelos terapéuticos poco confiables

para los enfoques traslacionales con respecto a la toxicidad y la eficacia (Mall *et al*, 2016). Consecuentemente, este va a tener que ser un punto a considerar al momento de formular estrategias de inmunoterapia basadas en la combinación de agentes.

5.4 Análisis del reconocimiento antigénico por parte de un suero de conejo anti-*Trypanosoma cruzi* sobre muestras humanas de diferentes tumores y tejidos normales.

En función de la enorme cantidad de resultados obtenidos para las más de 700 muestras de tejidos humanos tumorales y normales analizadas por IHQ, podemos afirmar que existe un amplio horizonte con respecto a los diferentes modelos en los cuales podríamos ensayar nuestra estrategia de inmunoterapia anti-tumoral.

Pese a la heterogeneidad inter- e intra-tumoral ya mencionada, en la gran mayoría de los casos pareciera ser una regla el hecho de que los anticuerpos anti-*T. cruzi* reconocen estructuras antigénicas presentes preferentemente sobre células tumorales. Este reconocimiento se manifiesta a través de un inmunomarcado con un patrón de tipo citoplasmático difuso, con un mayor grado de intensidad a nivel peri-nuclear.

Cabe aclarar que para el estudio en cáncer colorrectal, donde contábamos con datos clínicos de los pacientes, nos sorprendieron los resultados señalados en la Figura 25B en tanto se desprende que no existen diferencias en la sobrevida global para pacientes cuyos tumores tienen diferentes grados de positividad en el inmunomarcado. Hubiésemos esperado que la sobrevida global para pacientes con tumores fuertemente reconocidos por los anticuerpos anti-*T. cruzi* fuese mayor, en tanto esto sería un indicativo de que se podría tratar de tumores más inmunogénicos contra los cuales se podrían haber montado respuestas inmunes más robustas.

Sin embargo también se podría analizar este fenómeno desde otra perspectiva: considerando el fenómeno de inmunoedición del cáncer y los mecanismos de inmuno-escape tumoral, tal vez aquellos individuos con tumores fuertemente reconocidos por los anticuerpos anti-*T. cruzi*, que por las razones mencionadas no estarían pudiendo montar respuestas inmunes anti-tumorales efectivas,

serían los que más se beneficiarían de una inmunoterapia basadas en nuestras vacunas.

A modo de resumen, con estos resultados a la vista podríamos hipotetizar sobre un posible efecto dual de nuestra vacuna formulada a partir de extractos proteicos de *T. cruzi*. Por un lado, como mencionamos anteriormente, muchas de las moléculas parasitarias constituyen PAMPs en sí mismas, de manera que habría un efecto adyuvante encargado de favorecer una buena activación de la rama innata de la inmunidad. Adicionalmente, y con todos los resultados obtenidos en esta Tesis acerca de la existencia de antígenos compartidos entre las células tumorales 4T1 y *T. cruzi*, podemos hablar de antígenos de reacción cruzada que estuviesen actuando como inmunógenos, de manera que se generen respuestas inmunes adaptativas contra ellos y, de esta forma, y por estar presentes también en las células tumorales, se lleve a cabo el proceso de eliminación tumoral.

Queda mucho por hacer con el fin de desentrañar cuáles serían los mecanismos inmunológicos involucrados en dicha eliminación tumoral. Por ejemplo, y tomando como base los resultados obtenidos por nuestro grupo para otros modelos celulares y animales, Ubillos *et al* demostraron en el modelo de carcinogénesis química en ratas que existe una activación de células T CD4⁺ y CD8⁺ y que los esplenocitos de animales inmunizados alcanzan mejores respuestas citotóxicas contra las células tumorales en comparación con los animales que recibieron adyuvante solo. Las respuestas inmunes anti-tumorales incluyeron un aumento en el número de células CD11b/c⁺ His48⁻ MHC II⁺, correspondientes a macrófagos y/o DCs, que exhibieron una actividad aumentada de NADPH-oxidasa. También se encontró que la vacunación con lisado de *T. cruzi* desarrolló anticuerpos específicos para células de cáncer de colon y de mama, que eran capaces de mediar la ADCC *in vitro* (Ubillos *et al*, 2016). Por otro lado, en modelos murinos se comprobó que la inmunización con el extracto de *T. cruzi* condujo a la activación de DCs y al reclutamiento de poblaciones celulares como ser linfocitos T CD8⁺ y células NK a los órganos linfoides secundarios. También se vio

aumentada la capacidad citotóxica de esplenocitos de animales inmunizados y se comprobó el papel que jugarían los glicanos presentes en las moléculas de dicho extracto en el fenómeno de protección observado (Monin, Tesis de Maestría, PEDECIBA Biología, 2011). Los mecanismos subyacentes a la actividad anti-tumoral observada en el modelo 4T1 podrían ser similares a los descritos o incluso podría tratarse de otros mecanismos.

6. CONCLUSIONES

A continuación se detallan las principales conclusiones extraídas de los resultados presentados en este trabajo:

- Se corroboró que el extracto de *T. cruzi* no ejerce un efecto citotóxico directo sobre células tumorales de la línea 4T1.
- Se confirmó el potencial terapéutico de vacunas formuladas a partir de un extracto de *T. cruzi* en un modelo de cáncer de mama con enfermedad diseminada de relevancia clínica.
- Mediante abordajes técnicos complementarios, se evidenció la presencia de antígenos de reacción cruzada entre el parásito y células tumorales de la línea 4T1, a partir del reconocimiento de estructuras antigénicas por parte de anticuerpos anti-*T. cruzi*.
- La vacunación con extractos de *T. cruzi* disminuyó la cantidad de células tumorales metastásicas a nivel pulmonar y aumentó la capacidad citotóxica anti-tumoral de esplenocitos de animales inmunizados.
- En una etapa inicial de caracterización del modelo animal, se encontró la expresión de moléculas asociadas a un fenotipo regulador a nivel de ganglios linfáticos drenantes de animales portadores de tumores.
- Luego del análisis de más de 700 muestras de tejidos humanos tumorales y no tumorales, se reafirmó que anticuerpos anti-*T. cruzi* reconocen preferentemente tejidos tumorales con variada intensidad pero con un mismo patrón de inmunomarcado. No se logró correlacionar el *score* de inmunomarcado con parámetros histo-patológicos para el caso del cáncer de mama humano ni con la sobrevida global para el caso del cáncer colorrectal humano.

7. PERSPECTIVAS

Los resultados arrojados por el presente trabajo plantean una enorme cantidad de nuevas preguntas y motivan el continuar investigando para poder acercarnos a las respuestas. Entre las principales perspectivas a futuro podemos destacar:

La identificación de los antígenos de reacción cruzada a través de un abordaje proteómico. Para ello planteamos llevar a cabo la separación de los extractos tumorales en geles bi-dimensionales y la posterior puesta a punto de *Western blots* con un suero de conejo anti-*T. cruzi* y un suero pre-inmune de conejo, de manera de obtener *spots* diferenciales que constituyan los blancos antigénicos a identificar por espectrometría de masas. Estos resultados podrían arrojar luz para conocer qué moléculas del parásito inducen la respuesta inmune anti-tumoral y podrían ser la base para la formulación de una nueva vacuna que tenga un eventual uso clínico.

La profundización en los aspectos inmunológicos vinculados a la respuesta anti-tumoral. Es mandatorio realizar un análisis exhaustivo de los mecanismos inmunológicos detrás del fenómeno de protección observado tras el uso de nuestras vacunas. Para ello resta evaluar el rol de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, la caracterización del tipo de respuesta celular desarrollada, entre otros.

La combinación de nuestras vacunas con otras estrategias de inmunoterapia anti-tumoral. Como ya mencionamos, sería interesante formular nuestra vacuna con vectores virales que expresen IL-12, así como también la combinación con anticuerpos monoclonales inhibidores de punto de control inmunológico y tal vez de esa forma poder potenciar los resultados obtenidos en el modelo 4T1.

El estudio de nuevas cepas y formas del ciclo de vida de *T. cruzi*. Es importante recordar que lo reportado en este trabajo corresponde a ensayos realizados utilizando la cepa Dm28c de la forma epimastigota del parásito *T. cruzi*. Como se mencionó anteriormente en la introducción, se han obtenido resultados en la misma línea utilizando diversas cepas del parásito, por lo que sería interesante ensayar nuevas cepas que puedan potenciar los efectos anti-tumorales observados, así como probar otros estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*.

El estudio de nuevos modelos animales tumorales de investigación pre-clínica. Nos proponemos poner a punto nuevos modelos animales de manera de validar nuestras vacunas en otros modelos de relevancia clínica, entre los cuales podrían encontrarse aquellos que se desprenden de los ensayos de IHQ en tejidos tumorales humanos.

8. BIBLIOGRAFÍA

Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007; 26:26(9):1324-37. doi:10.1038/sj.onc.1210220.

Al-Tameemi M, Chaplain M, d'Onofrio A. Evasion of tumors from the control of the immune system: consequences of brief encounters. *Biology Direct*. 2012; 7:31. doi: 10.1186/1745-6150-7-31.

Alvarez Errico D, Medeiros A, Míguez M, Casaravilla C, Malgor R, Carmona C, Nieto A, Osinaga E. O-glycosylation in *Echinococcus granulosus*: identification and characterization of the carcinoma-associated Tn antigen. *Experimental Parasitology*. 2001; 98(2):100-9. <https://doi.org/10.1006/expr.2001.4620>.

Arumugam T, Ramachandran V, Fournier KF, Wang H, Marquis L, Abbruzzese JL, Gallick GE, Logsdon CD, McConkey DJ, Choi W. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. *Cancer Research*. 2009; 69(14):5820-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2819.

Aslakson CJ, Miller FR. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Research*. 1992; 52(6):1399-405.

Atayde VD, Jasiulionis MG, Cortez M, Yoshida N. A recombinant protein based on *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp82 induces apoptotic cell death in melanoma cells. *Melanoma Research*. 2008; 18(3):172-83. doi: 10.1097/CMR.0b013e3282f6eaab.

Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001; 357(9255):539-45. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04046-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04046-0).

Bard F, Chia J. Cracking the Glycome Encoder: Signaling, Trafficking, and Glycosylation. *Trends Cell Biol*. 2016; 26(5):379-388. doi: 10.1016/j.tcb.2015.12.004.

Barrett MP, Burchmore RJ, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC, Cazzulo JJ, Krishna S. The trypanosomiases. 2003; 362(9394):1469-80. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14694-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14694-6).

Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews. Genetics*. 2005;6(8):611-22. doi:10.1038/nrg1656.

Buchbinder E, Hodi FS. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 and immune checkpoint blockade. *The Journal of Clinical Investigation*. 2015; 125(9):3377-83. doi: 10.1172/JCI80012.

Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, Stopeck A, Borden E, Miller MC, Matera J, Repollet M, Doyle GV, Terstappen LW, Hayes DF. Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(21):6403-9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1769.

Burnet, FM. Cancer – A biological approach. *British Medical Journal*. 1957; 1(5022):779-86.

Butterfield LH. Cancer vaccines. *BMJ*. 2015; 350:h988. doi: 10.1136/bmj.h988.

Butterfield LH. Lessons learned from cancer vaccine trials and target antigen choice. *Cancer Immunol Immunother*. 2016; 65(7):805-12. doi: 10.1007/s00262-016-1801-1.

Cai A, Keskin DB, DeLuca DS, Alonso A, Zhang W, Zhang GL, Hammond NN, Nardi V, Stone RM, Neuberg D, Sidney J, Brusic V, Wu CJ. Mutated BCR-ABL generates immunogenic T-cell epitopes in CML patients. *Clinical Cancer Research*. 2012; 18(20):5761-72. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1182.

Campo VL, Riul TB, Carvalho I, Baruffi MD. Antibodies against mucin-based glycopeptides affect *Trypanosoma cruzi* cell invasion and tumor cell viability. *Chembiochem*. 2014; 15(10):1495-507. doi: 10.1002/cbic.201400069.

Casaravilla C, Freire T, Malgor R, Medeiros A, Osinaga E, Carmona C. 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. *The Journal of Parasitology*. 2003; 89(4):709-14. doi: <https://doi.org/10.1645/GE-2970>.

Cheng GZ, Chan J, Wang Q, Zhang W, Sun CD, Wang LH. Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and

resistance to paclitaxel. *Cancer Research*. 2007; 67(5): 1979-87. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1479.

Cuervo P, Domont GB, De Jesus JB. Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. *Journal of Proteomics*. 2010; 73(5):845-67. doi: 10.1016/j.jprot.2009.12.012.

D'Avila H, Toledo DA, Melo RC. Lipid bodies: inflammatory organelles implicated in host-Trypanosoma cruzi interplay during innate immune responses. *Mediators of Inflammation*. 2012; 2012:478601. doi: 10.1155/2012/478601.

Deng J, Wang L, Chen H, Hao J, Ni J, Chang L, Duan W, Graham P, Li Y. Targeting epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells for chemoresistant ovarian cancer. *Oncotarget*. 2016; 7(34):55771-55788. doi: 10.18632/oncotarget.9908.

Desrichard A, Snyder A, Chan TA. Cancer Neoantigens and Applications for Immunotherapy. *Clinical Cancer Research*. 2016; 22(4):807-12. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-3175.

Dexter DL, Kowalski HM, Blazar BA, Fligielski Z, Vogel R, Heppner GH. Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. *Cancer Research*. 1978; 38(10):3174-81.

Díaz-Zaragoza M, Hernández-Ávila R, Viedma-Rodríguez R, Arenas-Aranda D, Ostoa-Saloma P. Natural and adaptive IgM antibodies in the recognition of tumor-associated antigens of breast cancer (Review). *Oncol Rep*. 2015; 34(3):1106-14. doi: 10.3892/or.2015.4095.

Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*. 1994; 1(6):447-56. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/1074-7613\(94\)90087-6](http://dx.doi.org/10.1016/1074-7613(94)90087-6).

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004; 21(2):137-48. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.017>.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*. 2015; 136(5):E359-86. doi: 10.1002/ijc.29210.

Freire T, Casaravilla C, Carmona C, Osinaga E. Mucin-type O-glycosylation in *Fasciola hepatica*: characterisation of carcinoma-associated Tn and sialyl-Tn antigens and evaluation of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase activity. *International Journal for Parasitology*. 2003; 33(1):47-56. doi: [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00231-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00231-X).

Freire T, Robello C, Soulé S, Ferreira F, Osinaga E. Sialyl-Tn antigen expression and O-linked GalNAc-Thr synthesis by *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003; 312(4):1309-16. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.060>.

Garcia SB, Aranha AL, Garcia FR, Basile FV, Pinto AP, de Oliveira EC, Zucoloto S. A retrospective study of histopathological findings in 894 cases of megacolon: what is the relationship between megacolon and colonic cancer? *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003; 45(2):91-3. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652003000200007>.

Geng SQ, Alexandrou AT, Li JJ. Breast cancer stem cells: Multiple capacities in tumor metastasis. *Cancer Lett*. 2014; 349(1):1-7. doi: 10.1016/j.canlet.2014.03.036.

Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012; 481(7381):306-13. doi: 10.1038/nature10762.

Greenberg RM. ABC multidrug transporters in schistosomes and other parasitic flatworms. *Parasitology International*. 2013; 62(6):647-53. doi: 10.1016/j.parint.2013.02.006.

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010; 140(6):883-99. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.025.

Guerra N, Tan YX, Joncker NT, Choy A, Gallardo F, Xiong N, Knoblaugh S, Cado D, Greenberg NM, Raulet DH. NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in

models of spontaneous malignancy. *Immunity*. 2008; 28(4):571-80. doi: 10.1016/j.immuni.2008.02.016.

Hamilton DH, Huang B, Fernando RI, Tsang KY, Palena C. WEE1 inhibition alleviates resistance to immune attack of tumor cells undergoing epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Research*. 2014; 74(9):2510-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1894.

Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996; 86(3):353-64. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80108-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80108-7).

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144(56):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Häuselmann I, Borsig L. Altered tumor-cell glycosylation promotes metastasis. *Front Oncol*. 2014; 4:28. doi: 10.3389/fonc.2014.00028.

He P, Zou Y, Hu Z. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. *Hum Vaccin Immunother*. 2015; 11(2):477-88. doi: 10.1080/21645515.2014.1004026.

Headon H, Wazir U, Kasem A, Mokbel K. Surgical treatment of the primary tumour improves the overall survival in patients with metastatic breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Mol Clin Oncol*. 2016; 4(5):863-867. doi: 10.3892/mco.2016.778.

Hirano F, Kaneko K, Tamura H, Dong H, Wang S, Ichikawa M, Rietz C, Flies DB, Lau JS, Zhu G, Tamada K, Chen L. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Research*. 2005; 65(3):1089-96.

Hotz B, Arndt M, Dullat S, Bhargava S, Buhr HJ, Hotz HG. Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*. 2007; 13(16):4769-76. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2926.

Iannello A, Thompson TW, Ardolino M, Marcus A, Raulet DH. Immunosurveillance and immunotherapy of tumors by innate immune cells. *Current Opinion in Immunology*. 2016; 38:52-8. doi: 10.1016/j.coi.2015.11.001.

Jin H, Yu Y, Zhang T, Zhou X, Zhou J, Jia L, Wu Y, Zhou BP, Feng Y. Snail is critical for tumor growth and metastasis of ovarian carcinoma. *International Journal of Cancer*. 2010; 126(9): 2102-11. doi: 10.1002/ijc.24901.

Julien S, Ivetic A, Grigoriadis A, QiZe D, Burford B, Sproviero D, Picco G, Gillett C, Papp SL, Schaffer L, Tutt A, Taylor-Papadimitriou J, Pinder SE, Burchell JM. Selectin ligand sialyl-Lewis x antigen drives metastasis of hormone-dependent breast cancers. *Cancer Res*. 2011; 71(24):7683-93. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1139.

Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(13):7556-61.

Kieber-Emmons T, Monzavi-Karbassi B, Hutchins LF, Pennisi A, Makhoul I. Harnessing benefit from targeting tumor associated carbohydrate antigens. *Hum Vaccin Immunother*. 2017; 13(2):323-331. doi: 10.1080/21645515.2017.1264789.

Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX, Zhang XH, Norton L, Massagué J. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell*. 2009; 139(7):1315-26. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.025.

Klymkowsky MW, Savagner P. Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *The American Journal of Pathology*. 2009; 174(5):1588-93. doi: 10.2353/ajpath.2009.080545.

Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, Smyth MJ, Schreiber RD. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*. 2007; 450(7171):903-7. doi: 10.1038/nature06309.

Kramer MG, Masner M, Casales E, Moreno M, Smerdou C, Chabalgoity JA. Neoadjuvant administration of Semliki Forest virus expressing interleukin-12 combined with attenuated *Salmonella* eradicates breast cancer metastasis and achieves long-term survival in immunocompetent mice. *BMC Cancer*. 2015; 15:620. doi: 10.1186/s12885-015-1618-x.

Krementsov N. Trypanosoma cruzi, cancer and the Cold War. *Hist Cienc Saude Manguinhos*. 2009; 1:75-94.

Kudo-Saito C, Shirako H, Takeuchi T, Kawakami Y. Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer Cell*. 2009; 15(3):195-206. doi: 10.1016/j.ccr.2009.01.023.

Kuroda E, Coban C, Ishii KJ. Particulate adjuvant and innate immunity: past achievements, present findings, and future prospects. *Int Rev Immunol*. 2013; 32(2):209-20. doi: 10.3109/08830185.2013.773326.

Kurrey NK, Jalgaonkar SP, Joglekar AV, Ghanate AD, Chaskar PD, Doiphode RY, Bapat SA. Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells. *Stem Cells*. 2009; 27(9): 2059-68. doi: 10.1002/stem.154.

Lauwaet T, Oliveira MJ, Mareel M, Leroy A. Molecular mechanisms of invasion by cancer cells, leukocytes and microorganisms. *Microbes and Infection*. 2000; 2(8):923-31. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00394-4](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00394-4).

Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, Cui YK, Delbrook C, Feldman SA, Fry TJ, Orentas R, Sabatino M, Shah NN, Steinberg SM, Stroncek D, Tschernia N, Yuan C, Zhang H, Zhang L, Rosenberg SA, Wayne AS, Mackall CL. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*. 2015; 385(9967):517-528. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61403-3.

Lim S, Becker A, Zimmer A, Lu J, Buettner R, Kirfel J. SNAI1-mediated epithelial-mesenchymal transition confers chemoresistance and cellular plasticity by regulating genes involved in cell death and stem cell maintenance. *PLOS One*. 2013; 8(6):e66558. doi: 10.1371/journal.pone.0066558.

López NC, Valck C, Ramírez G, Rodríguez M, Ribeiro C, Orellana J, Maldonado I, Albini A, Anaconda D, Lemus D, Aguilar L, Schwaeble W, Ferreira A. Antiangiogenic and antitumor effects of *Trypanosoma cruzi* Calreticulin. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4(7):e730. doi: 10.1371/journal.pntd.0000730.

Mall C, Sckisel GD, Proia DA, Mirsoian A, Grossenbacher SK, Pai CS, Chen M, Monjazebe AM, Kelly K, Blazar BR, Murphy WJ. Repeated PD-1/PD-L1 monoclonal antibody

administration induces fatal xenogeneic hypersensitivity reactions in a murine model of breast cancer. *Oncoimmunology*. 2015; 5(2):e1075114. doi: 10.1080/2162402X.2015.1075114.

Marin-Acevedo JA, Soyano AE, Dholaria B, Knutson KL, Lou Y. Cancer immunotherapy beyond immune checkpoint inhibitors. *J Hematol Oncol*. 2018; 11(1):8. doi: 10.1186/s13045-017-0552-6.

Martin-Liberal J, Hierro C, Ochoa de Olza M, Rodon J. Immuno-Oncology: The Third Paradigm in Early Drug Development. *Targeted Oncology*. 2017; 12(2):125-138. doi: 10.1007/s11523-016-0471-4.

Marusyk A, Almendro V, Polyak K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nature Reviews. Cancer*. 2012; 12(5):323-34. doi: 10.1038/nrc3261.

McCarthy EF. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *The Iowa Orthopedic Journal*. 2006; 26:154-8.

Meacham CE, Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*. 2013; 501(7467):328-37. doi: 10.1038/nature12624.

Medeiros A, Chiribao ML, Ubillos L, Festari MF, Saldaña J, Robello C, Domínguez L, Calvete JJ, Osinaga E. Mucin-type O-glycosylation in *Mesocestoides vogae* (syn. *corti*). *International Journal for Parasitology*. 2008; 38(3-4):265-76. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.07.015>.

Meezan E, Wu HC, Black PH, Robbins PW. Comparative studies on the carbohydrate-containing membrane components of normal and virus-transformed mouse fibroblasts. II. Separation of glycoproteins and glycopeptides by sephadex chromatography. *Biochemistry*. 1969; 8(6):2518-24.

Molina MC, Ferreira V, Valck C, Aguilar L, Orellana J, Rojas A, Ramirez G, Billetta R, Schwaeble W, Lemus D, Ferreira A. An in vivo role for *Trypanosoma cruzi* calreticulin in antiangiogenesis. *Mol Biochem Parasitol*. 2005; 140(2):133-40. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2004.12.014>.

- Oliveira EC, Leite MS, Miranda JA, Andrade AL, Garcia SB, Luquetti AO, Moreira H. Chronic *Trypanosoma cruzi* infection associated with low incidence of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. *Carcinogenesis*. 2001; 22(5):737-40.
- Olkhanud PB, Damdinsuren B, Bodogai M, Gress RE, Sen R, Wejksza K, Malchinkhuu E, Wersto RP, Biragyn A. Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4⁺ T cells to T-regulatory cells. *Cancer Research*. 2011; 71(10):3505-15. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4316.
- Osinaga E. Expression of cancer-associated simple mucin-type O-glycosylated antigens in parasites. *IUBMB Life*. 2007; 59(4-5):269-73. doi: 10.1080/15216540601188553.
- Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Cancer Metastasis Reviews*. 1989; 8(2):98-101.
- Palena C, Roselli M, Litzinger MT, Ferroni P, Costarelli L, Spila A, Cavaliere F, Huang B, Fernando RI, Hamilton DH, Jochems C, Tsang KY, Cheng Q, Lysterly HK, Schlom J, Guadagni F. Overexpression of the EMT driver brachyury in breast carcinomas: association with poor prognosis. *Journal of the National Cancer Institute*. 2014; 106(5):dju054. doi: 10.1093/jnci/dju054.
- Pérez-Victoria JM, Di Pietro A, Barron D, Ravelo AG, Castanys S, Gamarro F. Multidrug resistance phenotype mediated by the P-glycoprotein-like transporter in *Leishmania*: a search for reversal agents. *Current Drug Targets*. 2002; 3(4):311-33. doi: 10.2174/1389450023347588.
- Pitt JM, Vétizou M, Daillère R, Roberti MP, Yamazaki T, Routy B, Lepage P, Boneca IG, Chamaillard M, Kroemer G, Zitvogel L. Resistance Mechanisms to Immune-Checkpoint Blockade in Cancer: Tumor-Intrinsic and -Extrinsic Factors. *Immunity*. 2016; 44(6):1255-69. doi: 10.1016/j.immuni.2016.06.001.
- Potapenko IO, Lüders T, Russnes HG, Helland Å, Sørli T, Kristensen VN, Nord S, Lingjærde OC, Børresen-Dale AL, Haakensen VD. Glycan-related gene expression signatures in breast cancer subtypes; relation to survival. *Mol Oncol*. 2015; 9(4):861-76. doi: 10.1016/j.molonc.2014.

Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W, Jung H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annual Review of Immunology*. 2013; 31:413-41. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095951.

Roselli M, Fernando RI, Guadagni F, Spila A, Alessandrini J, Palmirotta R, Costarelli L, Litzinger M, Hamilton D, Huang B, Tucker J, Tsang KY, Schlom J, Palena C. Brachyury, a driver of the epithelial-mesenchymal transition, is overexpressed in human lung tumors: an opportunity for novel interventions against lung cancer. *Clinical Cancer Research*. 2012; 18(14):3868-79. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3211.

Roskin G. Toxin therapy of experimental cancer; the influence of protozoan infections upon transplanted cancer. 1946; 6:363-5.

Roskin G, Exemplarskaia E. Protozoeninfektion und experimenteller Krebs. I. *Mitteilung. Zeitschrift für Krebsforschung*. 1931; 34:628-645.

Sampson JH, Heimberger AB, Archer GE, Aldape KD, Friedman AH, Friedman HS, Gilbert MR, Herndon JE 2nd, McLendon RE, Mitchell DA, Reardon DA, Sawaya R, Schmittling RJ, Shi W, Vredenburgh JJ, Bigner DD. Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2010; 28(31):4722-9. doi: 10.1200/JCO.2010.28.6963.

Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, Old LJ, Chen YT. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunological Reviews*. 2002; 188:22-32. doi: 10.1034/j.1600-065X.2002.18803.x.

Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011; 331(6024):1565-70. doi: 10.1126/science.1203486.

Schwartz-Albiez R. Naturally occurring antibodies directed against carbohydrate tumor antigens. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2012; 750:27-43. doi: 10.1007/978-1-4614-3461-0_3.

Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumor development and shape tumor immunogenicity. *Nature*. 2001; 410:1107-11. doi: 10.1038/35074122.

Sheikhi A, Jafarzadeh A, Kokhaei P, Hojjat-Farsangi M. Whole Tumor Cell Vaccine Adjuvants: Comparing IL-12 to IL-2 and IL-15. *Iran J Immunol*. 2016; 13(3):148-66. doi: 10.1007/s13337-016-0301-1.

Sheklakova LA, Kallinikova VD, Karpenko LP. Genetic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* and its direct anticancer effect in cultured human tumor cells. *Bull Exp Biol Med*. 2003; 135(1):89-92.

Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annual Review of Immunology*. 2010; 28:367-88. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132603.

Spaderna S, Schmalhofer O, Hlubek F, Berx G, Eger A, Merkel S, Jung A, Kirchner T, Brabletz T. A transient, EMT-linked loss of basement membranes indicates metastasis and poor survival in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2006; 131(3):830-40. doi: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2006.06.016>.

Spill F, Reynolds DS, Kamm RD, Zaman MH. Impact of the physical microenvironment on tumor progression and metastasis. *Current Opinion in Biotechnology*. 2016; 40:41-48. doi: 10.1016/j.copbio.2016.02.007.

Stowell SR, Ju T, Cummings RD. Protein glycosylation in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2015; 10:473-510. doi: 10.1146/annurev-pathol-012414-040438.

Stutman O. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science*. 1974; 183(4124):534-6. doi: 10.1126/science.183.4124.534.

Stutman O. Delayed tumour appearance and absence of regression in nude mice infected with murine sarcoma virus. *Nature*. 1975; 235(5487):142-4. doi:10.1038/253142a0.

Suda K, Tomizawa K, Fujii M, Murakami H, Osada H, Maehara Y, Yatabe Y, Sekido Y, Mitsudomi T. Epithelial to mesenchymal transition in an epidermal growth factor receptor-mutant lung cancer cell line with acquired resistance to erlotinib. *Journal of Thoracic Oncology*. 2011; 6(7):1152-61. doi: 10.1097/JTO.0b013e318216ee52.

Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Research*. 2010; 70(14):5649-69. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1040.

Thomas, L. Discussion in cellular and humoral aspects of the hypersensitivity states. New York: Hoeber-Harper. 1959; 529-532.

Tsung K, Norton JA. In situ vaccine, immunological memory and cancer cure. *Hum Vaccin Immunother*. 2016; 12(1):117-9. doi: 10.1080/21645515.2015.1073427.

Ubillos L, Medeiros A, Cancela M, Casaravilla C, Saldaña J, Domínguez L, Carmona C, Le Pendu J, Osinaga E. Characterization of the carcinoma-associated Tk antigen in helminth parasites. *Experimental Parasitology*. 2007; 116(2):129-36. doi: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.12.009>.

Ubillos L, Freire T, Berriel E, Chiribao ML, Chiale C, Festari MF, Medeiros A, Mazal D, Rondán M, Bollati-Fogolín M, Rabinovich GA, Robello C, Osinaga E. Trypanosoma cruzi extracts elicit protective immune response against chemically induced colon and mammary cancers. *International Journal of Cancer*. 2016; 138(7):1719-31. doi: 10.1002/ijc.29910.

Vojta A, Samaržija I, Bočkor L, Zoldoš V. Glyco-genes change expression in cancer through aberrant methylation. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1860(8):1776-85. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.01.002.

Wagner-Jauregg J. Verhütung und Behandlung der progressiven Paralyse durch Impfmalaria [Prevention and treatment of progressive paralysis by malaria inoculation]. *Handbuch der experimentellen Therapie Ergänzungsband*. 1931.

Ward JP, Gubin MM, Schreiber RD. The role of neoantigens in naturally occurring and therapeutically induced immune responses to cancer. *Advances in Immunology*. 2016; Volume 130, Chapter 2:25-74.

Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, Ting DT, Isakoff SJ, Ciciliano JC, Wells MN, Shah AM, Concannon KF, Donaldson MC, Sequist LV, Brachtel E, Sgroi D, Baselga J, Ramaswamy S, Toner M, Haber DA, Maheswaran S. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science*. 2013; 339(6119):580-4. doi: 10.1126/science.1228522.

Zenina AV, Kravtsov EG, Tsetsegsaikhan B, Yashina NV, Dalin MV, Karpenko LP, Sheklakova LA, Kallinikova V. The study of immunological component in antitumor effect of *Trypanosoma cruzi*. *Bull Exp Biol Med*. 2008; 145(3):352-4.

Zhang L, Feng D, Hu Y, Tsung K, Norton JA. IL-12 augments antitumor responses to cycled chemotherapy. *Journal of Immunotherapy*. 2015; 38(4):137-44. doi: 10.1097/CJI.0000000000000074.

Zhang Q, Zhu B, Li Y. Resolution of Cancer-Promoting Inflammation: A New Approach for Anticancer Therapy. *Frontiers in Immunology*. 2017; 8:71. doi: 10.3389/fimmu.2017.00071.

Zhao D, Besser AH, Wander SA, Sun J, Zhou W, Wang B, Ince T, Durante MA, Guo W, Mills G, Theodorescu D, Slingerland J. Cytoplasmic p27 promotes epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis via STAT3-mediated Twist1 upregulation. *Oncogene*. 2015; 34(43):5447:59. doi: 10.1038/onc.2014.473.