

O-glicosilación incompleta en células cancerígenas y parásitos: Importancia biomédica.

Mary Carmen Pérez-Aguilar¹, Loredana Goncalves¹, Nora Mogollón², Rafael Bonfante-Cabarcas³

RESUMEN

Durante la carcinogénesis ocurren modificaciones importantes en la glicosilación, entre ellas la elongación incompleta de las cadenas sacarídicas con uniones de tipo O y la exposición de antígenos que en condiciones normales estaban ocultos, los cuales son reconocidos por componentes de la respuesta inmune que promueven o limitan el crecimiento tumoral. Diversos estudios reportan que estructuras asociadas a tumor tales como los antígenos Tn y sialil-Tn se expresan en algunos parásitos protozoarios y helmintos, planteando numerosas interrogantes a nivel de la interacción parásito-hospedador. Considerando que existe una correlación negativa entre ciertas infecciones parasitarias y el desarrollo de cáncer, los antígenos de O-glicosilación incompleta obtenidos de parásitos podrían ser potenciales blancos en la inmunoterapia del cáncer.

Palabras clave: O-glicosilación, cáncer, parásito, antígenos asociados a tumor.

ABSTRACT

Incomplete O-glycosylation in cancer cells and parasites: biomedical significance

During carcinogenesis important modifications in glycosylation occur, among them incomplete elongation of the saccharide chains with type O bonds and the exposure of antigens that were hidden under normal conditions, which are recognized by components of the immune system which promote or limit tumor growth. Several studies report that tumor-associated structures, such as Tn and sialil-Tn, are expressed in some parasites protozoa and helminths, and pose many questions regarding parasite-host interaction. Considering the negative correlation between certain parasite infections and cancer development, antigens from incomplete O-glycosylation obtained from parasites could be potential targets in cancer immunotherapy

Key words: O-glycosylation, cancer, parasite, tumor-associated antigens.

¹ Laboratorio de Inmunología de Parasitosis (LABINPAR). Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela.

² Laboratorio de Enzimología de Parásitos (LEP). Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela.

³ Unidad de Bioquímica, Decanato de Ciencias de la Salud Dr. Pablo Acosta Ortiz. Universidad Centro-Occidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto-Venezuela.

Correspondencia: Mary Carmen Pérez Aguilar

E-mail: m.perez@ula.ve

Recibido: Octubre 2012 **Aprobado:** Mayo 2013

INTRODUCCIÓN

Glicosilación es la modificación covalente más frecuente en las proteínas y ocurre por la unión de una o más cadenas oligosacarídicas a la secuencia aminoacídica (1). Dicho proceso le otorga diferentes características estructurales y funcionales a las proteínas, confiriéndoles mayor estabilidad ante las modificaciones fisicoquímicas del medio y contribuyendo en su correcto patrón de plegamiento (2). Adicionalmente, esta modificación está involucrada en diversos tipos de interacción ligando-receptor y, por ende, participa en procesos biológicos tales como la diferenciación celular, la invasión del cáncer, así como la infectividad viral, bacteriana y parasitaria (3,4).

Existen dos tipos de glicosilación de proteínas, dependiendo del lugar de adición de los carbohidratos: la N-glicosilación y la O-glicosilación. La N-glicosilación se lleva a cabo en el retículo endoplasmático rugoso y comienza con la síntesis de un oligosacárido común constituido por catorce residuos de monosacáridos (dos N-acetilglucosaminas, tres glucosas y nueve manosas) unido a un transportador lipídico (dolicol fosfato) anclado a la membrana del retículo endoplasmático (5). En el proceso, el oligosacárido es transferido como una unidad completa a un residuo de asparagina aceptora que forma parte de la secuencia consenso Asn-X-Ser o Asn-X-Thr de la cadena polipeptídica en crecimiento. Una vez unido a la proteína, este oligosacárido pierde tres residuos de glucosa y uno de manosa (6). Posteriormente, la proteína sufre modificaciones postraduccionales que incluyen tanto la eliminación como la adición de residuos de monosacáridos a medida que es transportada por los distintos compartimientos del aparato de Golgi (2).

La O-glicosilación ocurre directamente en el aparato de Golgi y comienza con la unión de N-acetilgalactosamina (GalNAc) al grupo hidroxilo de un residuo de serina (Ser) o treonina (Thr) presente en el esqueleto polipeptídico, formando el antígeno Tn (GalNAc-Thr/Ser) (5). La complejidad estructural de las cadenas oligosacarídicas de tipo O es mucho mayor que las de tipo N, debido a la existencia de ocho core (donde se encuentran los carbohidratos más cercanos al sitio de unión con la cadena polipeptídica) que se originan mediante la acción de glicosiltransferasas específicas que actúan de manera secuencial (Figura 1). El core 1 se sintetiza por la adición de un residuo de galactosa unido por un enlace β 1,3 a la GalNAc presente en el antígeno Tn. Esta estructura conocida como antígeno T o de Thomsen-Friedenreich (Gal β 1,3GalNAc-Thr/Ser) forma el core 2 mediante la acción de la glicosiltransferasa β 1,6GlcNAc-T

(7). Al antígeno Tn se le puede unir GlcNAc formando los core 3,4 y 6 y GalNAc para originar los core 5,7 y 8. El antígeno sialil-Tn (NeuAc2,6GalNAc-Thr/Ser) se genera mediante la actividad de una sialiltransferasa que incorpora ácido siálico (Sia) en unión α 2,6 al antígeno Tn (8,9).

A partir de los core formados, las cadenas sacarídicas se elongan o ramifican dando como resultado estructuras más complejas. Las ramificaciones que parten de N-acetilglucosamina (GlcNAc) con enlace β 1,6 generan el antígeno H, mientras que las ramificaciones que sufren tanto el antígeno Tn como el antígeno T por acción de diversas enzimas sialiltransferasas (STs) o fucosiltransferasas (FucTs) dan origen a los antígenos Lewis. (6,7,10).

O-glicosilación incompleta en células tumorales. El cáncer es una enfermedad en la que ocurren una serie de alteraciones irreversibles en la maquinaria genética de las células normales que las inducen a crecer de manera autónoma y descontrolada, aun cuando el estímulo inicial haya desaparecido y a pesar de los sistemas que vigilan y modulan la división celular. Luego de un período de tiempo variable los tumores malignos evolucionan, su población celular se torna heterogénea y progresan a formas capaces de evadir la respuesta inmune antitumoral; se proveen de oxígeno y nutrientes a través de la formación de una red vascular propia e invaden tejidos vecinos o producen metástasis a distancia (9,10).

Dentro de las alteraciones moleculares más distintivas de las células cancerígenas se encuentra la elongación incompleta de las cadenas sacarídicas con uniones de tipo O. Este fenómeno determina que algunos core presentes en las células normales y que se encuentran enmascarados por la adición de azúcares queden expuestos en la superficie celular y formen nuevos antígenos asociados a tumor (11). Hasta el momento no se conocen completamente los mecanismos bioquímicos por los cuales las moléculas glicosiladas sufren alteraciones durante la carcinogénesis; no obstante, es posible que se deba a una modificación en la regulación de la expresión de glicosiltransferasas que catalizan las etapas iniciales de la O-glicosilación (12).

Algunos antígenos pueden estimular directamente las células B para producir anticuerpos sin requerir de la presencia de las células T cooperadoras (antígenos T independientes). Estos antígenos son homopolímeros con determinantes antigénicos repetidos y muchos de ellos poseen la capacidad, a concentraciones elevadas, de activar clones de células B específicas de otros antígenos (activación policlonal); sin embargo, a bajas concentraciones sólo activan sus clones específicos. Debido a que los carbohidratos provocan una respuesta débil de anticuerpos independiente de células T, se han explorado diversos métodos para aumentar la inmunogenicidad de dichas moléculas (13). La estrategia más empleada consiste en conjugar estos antígenos con una proteína transportadora inmunogénica tal como la albúmina bovina sérica (BSA) o

la metaloproteína presente en la hemolinfa del gasterópodo *Megathura crenulata* (KLH).

Tn y Sialil-Tn están presentes en el 90% de los carcinomas, razón por la cual han despertado gran interés terapéutico y se han realizado numerosos esfuerzos en el desarrollo de inmunoterapias que los involucren (14). Diversos estudios señalan que ratones inmunizados con glicopéptidos Tn sintéticos desarrollan una respuesta inmunoprotectora antitumoral (15,16) cuya eficacia depende de la densidad de residuos Tn consecutivos en el inmunógeno, obteniéndose un mayor efecto inmunoprotector cuando los glicopéptidos presentan tres residuos Tn consecutivos (17). Kuduk y col. (18) observaron que tres residuos Tn consecutivos unidos de forma covalente a la KLH o la BSA más el adyuvante QS-21 estimularon la producción de títulos elevados de IgM e IgG contra Tn en ratones; estos anticuerpos fueron fuertemente reactivos frente a la línea de cáncer de colon LCS positiva para Tn sin mostrar ningún efecto cuando se empleó la línea celular LSB que no expresa Tn. El efecto inmunoprotector dependiente del número de residuos consecutivos no está restringido al Tn, puesto que también ha sido observado con el antígeno sialil-Tn, el cual conjugado a KLH ha sido empleado para inmunizar pacientes con cáncer de mama de alto riesgo (19).

A pesar de la eficacia de estas vacunas en modelos pre-clínicos, su uso en pacientes es limitado puesto que la especificidad de los anticuerpos producidos, así como la correlación nivel de anticuerpos-respuesta clínica no es constante. Por otro lado, el uso de moléculas portadoras acarrea diferentes inconvenientes como la producción de anticuerpos contra la proteína transportadora y la heterogeneidad química en la composición del conjugado final (20). Una alternativa eficaz a este tipo de estrategia comprende el uso de péptidos antigénicos múltiples (MAP) (21,22), los cuales no requieren de la proteína transportadora; sin embargo, la síntesis química y purificación de dichas moléculas es compleja y su costo es extremadamente elevado, lo cual hace difícil su explotación a gran escala (23).

Las mucinas como marcadores glicosilados en cáncer. Las mucinas son glicoproteínas de alto peso molecular presentes en el moco, el epitelio respiratorio, el tracto gastrointestinal, aparato reproductor y en la superficie de diversos parásitos protozoarios y helmintos (24-27). Se caracterizan por presentar cadenas complejas de oligosacáridos unidas a proteínas por enlaces O-glicosídicos y por sufrir modificaciones estructurales y funcionales en respuesta a procesos inflamatorios o de transformación celular producto de la expresión de nuevas estructuras de oligosacáridos (6).

Dichas glicoproteínas son los principales representantes de los O-oligosacáridos con core 1 y 2, siendo estos núcleos sacarídicos los que generan la mayor parte de los antígenos asociados a tumor (1). Estructuralmente, poseen dos regiones principales: la región que comprende los

dominios amino y carboxilo terminal, donde se encuentran varios residuos de cisteína que participan en la formación de puentes disulfuro entre los monómeros de mucina, así como una región central ubicada entre los dominios amino y carboxilo terminal, la cual es rica en residuos de Ser o Thr; éstos últimos se agrupan en secuencias de 10 a 80 aminoácidos que se repiten a lo largo de la región central y son susceptibles de ser O-glicosiladas por la acción de la enzima GalNAc transferasa (24).

Existen tres familias de mucinas humanas (MUC): la primera familia corresponde a las mucinas que se encuentran asociadas a la membrana celular y está representada por MUC-1, MUC-3 y MUC-4; los genes que codifican para estas glicoproteínas se encuentran ubicados en el cromosoma 7q22 (25). La segunda familia corresponde a mucinas formadoras de moco y está representada por MUC-2, MUC-5 y MUC-6; los genes que codifican para estas glicoproteínas se encuentran ubicados en el cromosoma 11p15 (26) y la tercera familia corresponde a las mucinas solubles, representada por MUC-7 que es codificada en el cromosoma 4q13 (27).

MUC1 se expresa en células T, en células endoteliales y es un ligando de la molécula de adhesión ICAM-1 (28). Su función está relacionada con la regulación de moléculas de adhesión como cateninas, integrinas y caderinas (29-31). En las células T actúa como receptor relacionado con la activación celular, mientras que en células neoplásicas participa en procesos de adhesión, metástasis y evasión de la respuesta inmune (32).

El dominio extracelular de MUC1 se caracteriza por tener secuencias repetidas de 20 aminoácidos ricos en Ser y Thr, cada una de las cuales tiene 5 sitios potenciales de O-glicosilación (32). En células epiteliales normales la estructura de MUC1 es muy ramificada y compleja, pero en células tumorales se modifica el grado de glicosilación de la molécula la cual puede expresar algún tipo de O-oligosacárido rico en GlcNAc con terminaciones con Sia, debido a que las enzimas GlcNAc y STs están sobre-expresadas dando lugar a una forma hiperglicosilada. No obstante; también puede ocurrir una biosíntesis incompleta, debido a que no se expresó alguna glicosiltransferasa (GTs), lo que genera mucinas hipoglicosiladas o con cadenas sacarídicas cortas, dejando expuesto al antígeno Tn (33,34).

La consecuencia biológica para cada subtipo de MUC1 es diferente, mientras que la hiperglicosilada favorece la progresión del tumor y es poco inmunogénica porque los epítopes antigénicos quedan cubiertos por las múltiples ramificaciones presentes en la parte sacarídica de la molécula; la forma MUC1 hipoglicosilada, por el contrario, es altamente antigénica y participa en la activación de la respuesta antitumoral (35), por lo que está siendo considerada como candidata para la inmunoterapia del cáncer (36). Hasta el momento, se desconocen los mecanismos de regulación en ambos subtipos de MUC1;

sin embargo, pudiesen estar asociados a estímulos del microambiente, factores genéticos u hormonales.

O-glicosilación incompleta en parásitos y su relación con cáncer. Diversos factores biológicos pueden favorecer el desarrollo de cáncer, como por ejemplo la relación inequívoca entre ciertas infecciones parasitarias y algunos tipos de cáncer. Está plenamente establecido que el tremátodo *Opisthorchis viverrini* es un agente causal de colangiocarcinomas humanos, mientras que *Clonorchis sinensis* es considerado como una causa muy probable (37). Por otro lado, numerosos estudios sugieren el desarrollo de diferentes tipos de cáncer asociados a Schistosomiasis y en los últimos años se ha observado una asociación entre neoplasias intracraneales y la infección por *Toxoplasma gondii* (38-41). No obstante, en algunos parásitos se expresan antígenos de O-glicosilación incompleta, hecho que llama la atención y plantea numerosas interrogantes a nivel de la glicobiología parasitaria, de la relación parásito-hospedador y de las eventuales relaciones entre la biología de algunos parásitos y las células cancerígenas.

El tremátodo *Schistosoma mansoni* expresa una glicoproteína rica en Thr/Ser en las células epiteliales del tracto reproductivo del gusano hembra, además de ser el primer parásito en el que se identificó la estructura Tn en el esquistocóculo y en el gusano adulto (42). En el cestode *Echinococcus granulosus* se han identificado los antígenos Tn y sialil-Tn, estos antígenos están presentes tanto en el parénquima como en el tegumento, encontrándose altos niveles de Tn en la fracción de excreción/secreción, lo que sugiere que el antígeno puede participar en mecanismos de interacción con el hospedador (43).

En *Fasciola hepática* Tn se expresa principalmente en los testículos, mientras que las glicoproteínas que contienen sialil-Tn están ampliamente distribuidas en las células del parénquima, la membrana basal del tegumento y la superficie apical de las células epiteliales que tapizan los ciegos (44). Se ha observado que Tn también se expresa en parásitos helmintos como *Taenia hydatigena*, *Mesocestoides corti*, *Nippostrongylus brasiliensis* y *Toxocara canis* (45). Las semejanzas descritas anteriormente a nivel estructural podrían conducir a interacciones entre enfermedades causadas por infecciones parasitarias y el desarrollo de cáncer.

Teniendo en cuenta el hallazgo de que los antígenos Tn y sialil-Tn se expresan en numerosos parásitos helmintos, Freire y col. (46) estudiaron la presencia de dichas estructuras en el protozoario *T. cruzi*, encontrando que los epimastigotes del parásito expresan sialil-Tn. Adicionalmente, los autores evaluaron la actividad ppGalNAc-T (enzima que cataliza la primera etapa de la O-glicosilación) y caracterizaron los glicopéptidos resultantes de la glicosilación in vitro, los resultados obtenidos mostraron que los extractos de epimastigotes tienen actividad ppGalNAc-T; los glicopéptidos sintetizados por la actividad ppGalNAc-T in

vitro son reconocidos por anticuerpos y por lectinas anti-GalNAc y el análisis de la composición de carbohidratos de estos glicopéptidos reveló la presencia exclusiva de GalNAc.

Existen mecanismos biológicos compartidos entre las células cancerígenas y algunos parásitos tales como el fenotipo invasor, que requiere de la capacidad para establecer adhesiones célula-célula y célula-matriz, desarrollar proteólisis y presentar motilidad (2). Tres de las moléculas relacionadas con el proceso de invasión y metástasis por las células cancerígenas (integrinas, metaloproteasas de matriz y el receptor de la quimiocina RANTES) también pueden participar en mecanismos de invasión por parásitos (47). Por otro lado, tanto las células malignas como algunos parásitos protozoarios (*Plasmodium* y *Leishmania*) tienen la capacidad de desarrollar mecanismos de resistencia a diferentes drogas de uso terapéutico (48).

Las bases moleculares acerca de la función de algunos parásitos en los procesos carcinogénicos no han sido completamente dilucidadas, siendo posible la participación de la reacción inflamatoria anti-parasitaria con generación de especies reactivas del oxígeno que pueden causar daño e inestabilidad genética en las células normales vecinas. Sin embargo, se ha observado un fenómeno opuesto: la disminución en la incidencia de cáncer de colon inducido por 1,2 dimetilhidrazina (DMH) en ratas en fase crónica de la infección por *T. cruzi* (49). Teniendo en cuenta que en cáncer de colon de rata inducido por DMH se expresa el antígeno sialil-Tn y la observación de que este antígeno está también presente en la superficie de *T. cruzi*, se podría considerar la hipótesis de una respuesta inmune anti-parasitaria con efectiva reacción cruzada frente a células cancerígenas.

Mel'nikov y col. (50) observaron que ratones Balb/c infectados con la cepa CH4 de *T. cruzi* e inoculados con el linfoma L5178Y-R al mes post-infección desarrollaron una actividad antitumoral la cual inhibió el crecimiento y metástasis del linfoma. Adicionalmente, el ensayo de citotoxicidad demostró una completa inhibición de la proliferación celular cuando células del melanoma B16/BL6 fueron cultivadas en presencia de medio condicionado de melanoma-*T. cruzi*.

Estudios realizados por nuestro grupo de investigación (51,52) en los que ratones C57/BL6 fueron infectados con la cepa YBM de *T. cruzi* y posteriormente inoculados con la línea celular del melanoma B16/BL6 a los 15 días post-infección, mostraron una reducción significativa del volumen del tumor, siendo el efecto mucho mayor en ratones en fase aguda de la infección. La reducción del volumen del tumor se correlacionó con la dosis del inóculo y el nivel de parasitemia. Los animales mostraron una menor tasa de mortalidad en comparación con los del grupo control de melanoma; los tumores presentaron extensas áreas de necrosis asociadas a depósitos de melanina, abundantes vénulas congestionadas y trastornos citopáticos con formas amastigotes en vacuolas parasitóforas dentro de las células

tumorales. In vitro, el medio condicionado Vero-T cruzi tuvo efecto citotóxico; disminuyendo la proliferación de células de melanoma, lo cual confirma que el *T. cruzi* inhibe el desarrollo del melanoma maligno en ratones C57/BL6 y sugiere que el fenómeno está relacionado con antígenos secretados/excretados con propiedades tumorocidas e inmunogénicas. Además del efecto citotóxico demostrado in vitro, y dado que el antígeno sialil-Tn es capaz de inducir una respuesta inmune contra células cancerígenas y ha sido detectado en la superficie de *T. cruzi*, se pudiese pensar que el sialil-Tn del parásito está involucrado en la inducción de una respuesta inmune cruzada la cual inhibe el crecimiento del tumor, lo cual representaría un mecanismo adicional de supresión.

CONCLUSIONES

La expresión de Tn y sialil-Tn podría influir en la biología parasitaria y en el desarrollo de nuevos procedimientos de diagnóstico, ya que está demostrada la eficiencia de la inmunidad antitumoral inducida por estos antígenos, particularmente cuando se presenta en residuos consecutivos.

El hecho de que estos antígenos de O-glicosilación incompleta se expresen en diversos parásitos plantea preguntas interesantes sobre los mecanismos involucrados en su formación, en la participación que puedan tener en la relación parásito-hospedador y en las posibles influencias que las infecciones parasitarias puedan tener en el tipo de respuesta antitumoral que pueda desarrollarse. Considerando la correlación negativa entre diversas infecciones parasitarias y el desarrollo de cáncer, los antígenos de O-glicosilación incompleta obtenidos de parásitos podrían considerarse potenciales blancos para la inmunoterapia del cáncer. Sin embargo, se hace necesario efectuar aún una mayor cantidad de ensayos en modelos pre-clínicos, ya que algunos parásitos como *Schistosoma haematobium*, *Opisthorchis viverrini* y *Clonorchis sinensis* han sido considerados agentes carcinogénicos indirectos que causan inflamación crónica, la cual puede generar la producción de quimiocinas, citocinas y prostaglandinas por parte de las células infectadas y las células del sistema inmunológico, así como la generación de especies reactivas del oxígeno (con efectos mutagénicos directos) promoviendo la desregulación del sistema inmunológico y de la angiogénesis. Las alteraciones presentes en el proceso de glicosilación de células neoplásicas se han visualizado como una estrategia para lograr un diagnóstico oportuno de diversos tipos de cáncer.

Sin embargo, el tipo y nivel de glicosilación de una glicoproteína está determinado por un número considerable de glicosilasas y glicosiltransferasas que actúan secuencialmente tanto en el retículo endoplasmático como en el aparato de Golgi, dando lugar a un gran número de estructuras de oligosacáridos. La gran diversidad de estructuras que se presentan en la superficie de una célula hace necesaria la

caracterización de su patrón de glicosilación, por lo que el estudio a fondo acerca de la expresión y regulación de los genes de glicosiltransferasas y mucinas puede desempeñar una función importante en la prevención y tratamiento del

cáncer, puesto que es posible que algunos parásitos también expresen antígenos correspondientes a otros tipos de core de la O-glicosilación aún no explorados y que ciertas glicosiltransferasas constituyan blancos moleculares de interés terapéutico.

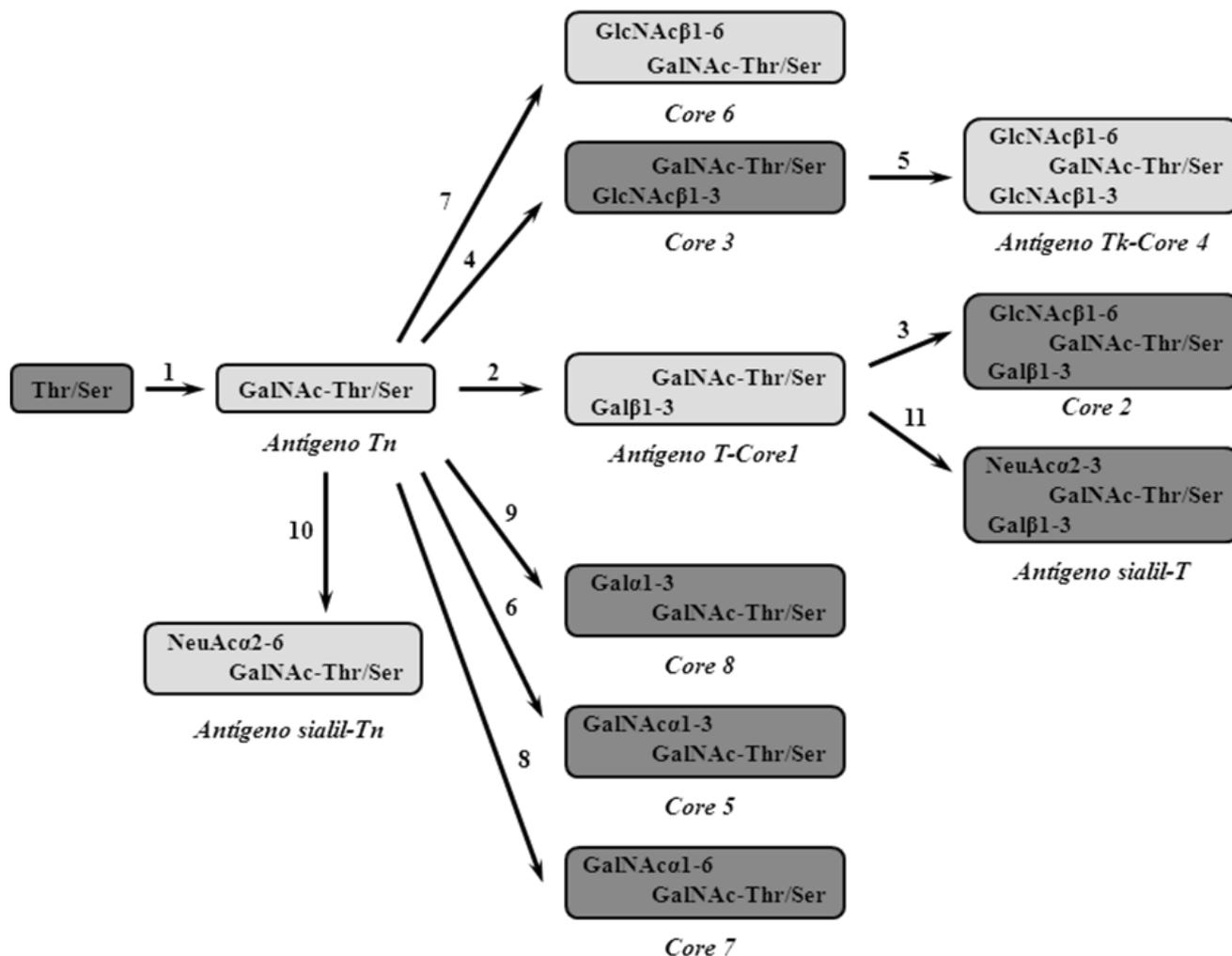


Figura 1. Estructura y biosíntesis del core de los O-oligosacáridos. En color gris claro se indican los principales antígenos asociados a tumor. La primera etapa de la O-glicosilación ocurre por la adición de GalNAc a un residuo de Thr o de Ser de la cadena polipeptídica (paso 1). Ocho tipos diferentes de core pueden formarse por la acción de diversas glicosiltransferasas: core 1 β 3Gal-T (paso 2), core 2 β 6GlcNAc-T (paso 3), core 3 β 3GlcNAc-T (paso 4), core 4 β 6GlcNAc-T (paso 5), core 5 α 3GalNAc-T (paso 6), core 6 β 6GlcNAc-T (paso 7), core 7 α 6GalNAc-T (paso 8) y core 8 α 3Gal-T (paso 9). Las estructuras sialil-Tn y sialil-T se forman mediante sialilación de los antígenos Tn y T en reacciones catalizadas por la α 6-sialil-T (paso 10) o la α 3sialil-T (paso 11), respectivamente. Tomado de Freire y col. (2).

REFERENCIAS

- Rosete PG, Atzín JA, Saldaña AK, Espinosa B, Urrea FJ, Vásquez NA, Lascurain R. Comportamiento tumoral y glicosilación. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2008; 21:280-287.
- Freire T, Robello C, Casaravilla C, Errico DA, Medeiros A, Carmona C, Osinaga E. Antígenos mucínicos de O-glicosilación simple: nuevas similitudes entre células cancerosas y parásitos. *Actas Fisiol* 2002; 8:89-107.
- Hanisch FG. O-glycosylation of the mucin type. *Biol Chem* 2001; 382:143-149.
- Hang HC, Bertozzi CR. The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation. *Bioorg Med Chem* 2005; 13:5021-5034.
- Tang X, Wu Y, Belenkaya TY, Huang Q, Ray L, Qu J, Lin X. Roles of N-glycosylation and lipidation in Wg secretion and signaling. *Dev Biol* 2012; 364:32-41.
- Opdenakker G, Dillen C, Fiten P, Martens E, Van Aelst I, Van den Steen PE, Nelissen I, Starckx S, Descamps FJ, Hu J, Piccard H, Van Damme J, Wormald MR, Rudd PM, Dwek RA. Remnant epitopes, autoimmunity and glycosylation. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760:610-615.

7. Varki A, Etzler ME, Cummings RD, Esko JD. Discovery and Classification of Glycan-Binding Proteins. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 26.
8. Julien S, Lagadec C, Krzewinski-Recchi MA, Courtand G, Le Bourhis X, Delannoy P. Stable expression of sialyl-Tn antigen in T47-D cells induces a decrease of cell adhesion and an increase of cell migration. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 90:77-84.
9. Ju T, Lanneau GS, Gautam T, Wang Y, Xia B, Stowell SR, Willard MT, Wang W, Xia JY, Zuna RE, Laszik Z, Benbrook DM, Hanigan MH, Cummings RD. Human tumor antigens Tn and sialyl Tn arise from mutations in Cosmc. *Cancer Res* 2008; 68:1636-1646.
10. Gutiérrez C, Alarcón E. Nivel de pobreza asociado al estadio de gravedad del cáncer ginecológico. *An Fac Med* 2008; 69:239-243.
11. T, Otto VI, Cummings RD. The Tn antigen-structural simplicity and biological complexity. *Angew Chem Int Ed Engl* 2011; 50:1770-1791.
12. Gallegos V, Itandehui B, Coutiño R, Martínez G, Hernández-Cruz P. Marcadores glicosilados en cáncer de mama. *REB* 2008; 27:52-59.
13. Slovin SF, Ragupathi G, Musselli C, Olkiewicz K, Verbel D, Kuduk SD, Schwarz JB, Sames D, Danishefsky S, Livingston PO, Scher HI. Fully synthetic carbohydrate-based vaccines in biochemically relapsed prostate cancer: clinical trial results with alpha-N-acetylgalactosamine-O-serine/threonine conjugate vaccine. *J Clin Oncol* 2003; 21:4292-4298.
14. Jeschke U, Mylonas I, Shabani N, Kunert-Keil C, Schindlbeck C, Gerber B, Friese K. Expression of sialyl lewis X, sialyl Lewis A, E-cadherin and cathepsin-D in human breast cancer: immunohistochemical analysis in mammary carcinoma in situ, invasive carcinomas and their lymph node metastasis. *Anticancer Res* 2005; 25:1615-1622.
15. Freire T, Osinaga E. Immunological and biomedical relevance of the Tn antigen. *Rev Immunol* 2003a; 1:27-38.
16. Lo-Man R, Bay S, Vichier-Guerre S, Deriaud E, Cantacuzene D, Leclerc C. A fully synthetic immunogen carrying a carcinoma-associated carbohydrate for active specific immunotherapy. *Cancer Res* 1999; 59:1520-1524.
17. Lo-Man R, Vichier-Guerre S, Bay S, Deriaud E, Cantacuzene D, Leclerc C. Anti-tumor immunity provided by a synthetic multiple antigenic glycopeptide displaying a tri-Tn glycotope. *J Immunol* 2001; 166:2849-2854.
18. Kuduk S, Schwarz J, Chen XT, Glunz P, Sames D, Ragupathi G, Livingston PO, Danishefsky SJ. Synthetic and immunological studies of clustered modes of mucin-related Tn and TF O-linked antigens: the preparation of a glycopeptide-based vaccines for clinical trials against prostate cancer. *J Am Chem Soc* 1998; 120:12474-12485.
19. Gilewski TA, Ragupathi G, Dickler M, Powell S, Bhuta S, Panageas K, Koganty RR, Chin Eng J, Hudis C, Norton L, Houghton AN, Livingston PO. Immunization of high risk breast cancer patients with clustered sTn-KLH conjugate plus the immunologic adjuvant QS-21. *Clin Cancer Res* 2007; 13:2977-2985.
20. Freire T, Bay S, Vichier-Guerre S, Lo-Man R, Leclerc C. Carbohydrate antigens: synthesis aspects and immunological applications in cancer. *Mini Rev Med Chem* 2006; 12:1357-1373.
21. Bay S, Lo-Man R, Osinaga E, Nakada H, Leclerc C, Cantacuzéne D.
22. Taniguchi N, Korekane H. Branched N-glycans and their implications for cell adhesion, signaling and clinical applications for cancer biomarkers and in therapeutics. *BMB Rep* 2011; 44:772-781.
23. Kowalczyk W, Monsó M, De la Torre BG, Andreu D. Synthesis of multiple antigenic peptides (MAPs)-strategies and limitations. *J Pept Sci* 2011; 4:247-251.
24. Couldrey C, Green JE. Metastases: the glycan connection. *Breast Cancer Res* 2000; 2:321-323.
25. Yamashita Y, Chung YS, Horie R, Kannagi R, Sowa M. Alterations in gastric mucin with malignants transformation: novel pathway for mucin synthesis. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:441-446.
26. Croce MV, Isla-Larrain M, Remes-Lenicov F, Colussi AG, Lacunza E, Kim KC, Gendler SJ, Segal-Eiras A. A MUC1 cytoplasmic tail detection using CT33 polyclonal and CT2 monoclonal antibodies in breast and colorectal tissue. *Histol Histopathol* 2006; 21:849-855.
27. Xu Y, Kimura N, Yoshida R, Lin H, Yoshinaga K. Immunohistochemical study of Muc1, Muc2 and human gastric mucin in breast carcinoma: relationship with prognostic factors. *Oncol Rep* 2001; 8:1177-1182.
28. Hayashi T, Takahashi T, Motoya S, Ishida T, Itoh F, Adachi M, Hinoda Y, Imai K. MUC1 mucin core protein binds to the domain 1 of ICAM-1. *Digestion* 2001; 63:87-92.
29. Rakha EA, Boyce RW, Abd El-Rehim D, Kurien T, Green AR, Paish EC, Robertson JF, Ellis IO. Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC and MUC6) and their prognostic significance in human breast cancer. *Mod Pathol* 2005; 18:1295-1304.
30. Reis CA, David L, Seixas M, Burchell J, Sobrinho-Simões M. Expression of fully and under-glycosylated forms of MUC1 mucin in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1998; 79:402-410.
31. Li YS, Kaneko M, Sakamoto DG, Takeshima Y, Inai K. The reversed apical pattern of MUC1 expression is characteristics of invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Breast Cancer* 2006; 13:58-63.

32. McDermott KM, Crocker PR, Harris A, Burdick MD, Hinoda Y, Hayashi T. Overexpression of MUC1 reconfigures the binding properties of tumor cells. *Int J Cancer* 2001; 94:783-791.
33. Quinlin IS, Burnside JS, Dombrowski KE, Phillips CA, Dolby N, Wright SE. Context of MUC1 epitope: immunogenicity. *Oncol Rep* 2007; 17:453-456.
34. Xu Y, Sette A, Sidney J, Gendler SJ, Franco A. Tumor associated carbohydrate antigens: a possible avenue for cancer prevention. *Immunol Cell Biol* 2005; 83:440-448.
35. Stepensky D, Tzehoval E, Vadai E, Eisenbach L. Oglycosylated versus non glycosylated MUC1-derived peptides as potential targets for cytotoxic immunotherapy of carcinoma. *Clin Exp Immunol* 2006; 143:139-149.
36. Osinaga E. Expression of cancer-associated simple mucin type O-glycosylated antigens in parasites. *IUBMB Life* 2007; 59:269-273.
37. Watanapa P, Watanapa WB. Liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Br J Surg* 2002; 89:962-970.
38. Abdel-Rahim AY. Parasitic infections and hepatic neoplasia. *Dig Dis* 2001; 19:288-291.
39. Del Brutto OH, Dolezal M, Castillo PR, Garcia HH. Neurocysticercosis and oncogenesis. *Arch Med Res* 2000; 31:151-155.
40. Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro Oncol* 2002; 4:278-299.
41. Kenneth A, Ainur K, Yeldar B. Role of infectious agents in the carcinogenesis of brain and head and neck cancers. *Infect Agent Cancer* 2013; 8: 7-9.
42. Thors C, Jansson B, Helin H, Linder E. Thomsen-Friedenreich oncofetal antigen in *Schistosoma mansoni*: localization and immunogenicity in experimental mouse infection. *Parasitology* 2006; 132:73-81.
43. Alvarez-Errico D, Medeiros A, Miguez 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. *Exp Parasitol* 2001; 98:100-109.
44. Freire T, Casaravilla C, Carmona C, Osinaga E. Mucin-type O-glycosylation in *Fasciola hepatica*: characterization of carcinoma-associated Tn and sialyl-Tn antigens and evaluation of UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase activity. *Int J Parasitol* 2003b; 33:47-56.
45. 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. *J Parasitol* 2003; 84:709-714.
46. Freire T, Robello C, Soulé S, Ferreira F, Osinaga E. Sialyl-Tn antigen expression and O-linked GalNAc-Thr synthesis by *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun* 2003c; 26:1309-1316.
47. Lauwaet T, Oliveira M, Mareel M, Leroy A. Molecular mechanisms of invasion by cancer cells, leukocytes and microorganisms. *Microbes Infect* 2000; 2:923-931.
48. Perez-Victoria J, Di Pietro A, Barron D, Ravelo A, Castanys S, Gamarro F. Multidrug resistance phenotype mediated by the P-glycoprotein-like transporter in *Leishmania*: a search for reversal agents. *Curr Drug Targets* 2002; 3:311-333.
49. Oliveira EC, Leite M, 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; 22:737-740.
50. Mel'nikov VG, Fierro Velasko FH, Dobrovinskaya OR. Suppression of growth and metastasizing of T-cell lymphoma in mice infected with american trypanosomiasis at different stages of experimental infection. *Bull Exp Biol Med* 2004; 137:475-478.
51. Rodríguez-Bonfante C, Bonfante-Cabarcas R, Ibarra A, Pérez-Aguilar MC, Labrador G. La infección por *Trypanosoma cruzi* inhibe el desarrollo del melanoma maligno. *Bol Med Post* 2008; 24:71-78.
52. Bonfante-Cabarcas R, Ibarra A, Salas Y, Colmenares de Páez V, Bonfante-Rodríguez R, Rodríguez-Bonfante C, Peter T. *Trypanosoma cruzi* inhibits the development of tumors in C57/BL6 mice and the growth of B16/BL6 melanoma cells in culture. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012. En prensa.