



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**Facultad de Química**

**Estimulación con agonistas sintéticos de  
TLR7/8 y TLR9 en un modelo murino de  
meduloblastoma**

**TESIS**

Que para obtener el título de  
**Química Farmacéutica-Bióloga**

**P R E S E N T A**

Daniela Melissa Abarca Merlín

**DIRECTOR DE TESIS**

Dra. María de Lourdes Álvarez Arellano



Ciudad Universitaria, CD. MX. 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: EUCLIDES ÁVILA CHAVEZ  
**VOCAL:** Profesor: OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA  
**SECRETARIO:** Profesor: MARIA DE LOURDES ÁLVAREZ ARELLANO  
**1er. SUPLENTE:** Profesor: JAVIER AXOSCO MARIN  
**2° SUPLENTE:** Profesor: EDGAR RICARDO VAZQUEZ MARTÍNEZ

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN NEUROCIENCIAS  
4TO PISO EDIFICIO ARTURO MUNDET  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO “DR. FEDERICO GÓMEZ”

## **ASESOR DEL TEMA:**

MARIA DE LOURDES ÁLVAREZ ARELLANO

## **SUSTENTANTE:**

DANIELA MELISSA ABARCA MERLÍN

La tesis presente se realizó bajo la tutoría de la Dra. María de Lourdes Álvarez Arellano en el Laboratorio de Investigación en Neurociencias dirigido por el Dr. Juan Carlos Corona en el Hospital Infantil de México “Dr. Federico Gómez”, CDMX.

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	1
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	2
i. Epidemiología del cáncer	2
ii. Meduloblastoma	3
ii. a. Diagnóstico, tratamiento y supervivencia del meduloblastoma	4
iii. Microambiente tumoral y tumorigénesis	5
iv. Inmunidad innata	9
iv. a. Receptores tipo Toll	9
iv. b. Señalización por receptores tipo Toll	12
v. Relación sistema inmunológico - cáncer	14
vi. Muerte celular: apoptosis	16
<b>II. ANTECEDENTES</b>	18
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	22
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	22
<b>V. OBJETIVO GENERAL</b>	23
<b>VI. OBJETIVOS PARTICULARES</b>	23
<b>VII. METODOLOGÍA</b>	24
vii. a. Cultivo celular	24
vii. b. Modelo murino de meduloblastoma	24
vii. c. Western Blot	25
vii. d. Inmunohistoquímica	26
vii. e. Zimograma	27
vii. f. Análisis estadístico	27
<b>VIII. RESULTADOS</b>	28
viii. a. Expresión de TLR7, TLR8 y TLR9 en xenotrasplantes murinos de meduloblastoma	28

viii. b. Efecto de la estimulación con CpG ODN y R848 sobre el volumen tumoral en xenotrasplantes murinos de meduloblastoma	30
viii. c. La expresión de la proteína MMP-3 disminuye en los tumores tratados con CpG ODN y R848	34
viii. d. Efecto del CpG ODN y el R848 sobre la proliferación celular tumoral en xenotrasplantes murinos de meduloblastoma	36
viii. e. Efecto de la estimulación con CpG ODN y R848 sobre la activación de caspasa-3 en xenotrasplantes murinos de meduloblastoma	41
viii. f. Efecto de la estimulación con CpG ODN y R848 sobre la expresión de MMP-2 y MMP-9 activas e inactivas en xenotrasplantes murinos de meduloblastoma	42
<b>IX. DISCUSIÓN</b>	<b>44</b>
<b>X. CONCLUSIONES</b>	<b>50</b>
<b>XI. PERSPECTIVAS</b>	<b>51</b>
<b>XII. ANEXO I</b>	<b>52</b>
<b>XIII. ANEXO II</b>	<b>53</b>
<b>XIV. REFERENCIAS</b>	<b>54</b>

## RESUMEN

El cáncer representa la segunda causa de muerte a nivel mundial y tiene un gran impacto social y económico en el mundo. De los 20 millones de casos nuevos anuales, en una población de 0-19 años, el 11% son tumores del SNC. El meduloblastoma es el tumor de SNC más frecuente en infantes y niños. El meduloblastoma se ubica en el cerebelo y tiene propensión a diseminarse e invadir tejidos adyacentes. La supervivencia de los pacientes es muy alta con los tratamientos actuales. Sin embargo, casi 80% de los sobrevivientes presentan secuelas importantes, consecuencia del tratamiento. Dentro de un solo tumor se han encontrado marcadores genéticos e histológicos que complican la clasificación e impiden el desarrollo de terapias eficaces. El microambiente tumoral contiene elementos del sistema inmunológico (SI) y células tumorales, los cuales interactúan entre sí y son críticos en la evolución, pronóstico y erradicación del tumor. Por ello, se han propuesto nuevas terapias dirigidas hacia componentes del microambiente tumoral, como son los receptores tipo Toll (TLRs). Los TLRs son receptores de la inmunidad innata que reconocen ligandos específicos, pueden expresarse tanto en células del SI, como en células tumorales y tienen efectos pro- o anti-tumorales. Previamente, en nuestro grupo de trabajo se encontró expresión de TLR7, TLR8 y TLR9 en biopsias de pacientes con meduloblastoma. Diferentes autores demostraron que la activación de TLR7 y TLR8 con R848, y TLR9 con algunos CpG ODNs puede erradicar tumores sólidos, inducir apoptosis de células malignas y reducir la angiogénesis en tumores del SNC. Por tal motivo, el objetivo del siguiente trabajo fue determinar la expresión de TLR7, TLR8 y TLR9 y el efecto de la estimulación de TLR7/8 y TLR9 con R848 y CpG ODN respectivamente, sobre el volumen tumoral, marcadores de proliferación celular; expresión de caspasa-3; y sobre la expresión de MMP-2, MMP-3 y MMP-9 en un modelo murino de meduloblastoma. Primero, medimos por western blot, la expresión de TLR7, TLR8 y TLR9 en los xenotrasplantes, encontrando que las células tumorales sólo expresaron TLR7 y TLR9. Posteriormente, los resultados demostraron que dos inyecciones intratumorales de CpG ODN disminuyeron el volumen tumoral de los xenotrasplantes murinos menores a 200 mm<sup>3</sup>. Mientras tanto, el R848 no tuvo efecto sobre el crecimiento tumoral. Después, evaluamos el efecto de R848 y CpG ODN sobre la expresión de MMP-3, un marcador de angiogénesis y se demostró que ambos agonistas redujeron significativamente su expresión comparados contra el control. A continuación, por western blot medimos la expresión de caspasa-3, un indicador de apoptosis y no se observó ningún efecto de los agonistas. Por último, utilizando un zimograma, se demostró que los tumores tratados con CpG ODN tienden a mostrar mayor expresión de MMP-2 y MMP-9, pero los resultados fueron no significativos. En conclusión, observamos que los xenotrasplantes murinos expresan TLR7 y TLR9, y no TLR8 bajo nuestras condiciones experimentales. También, demostramos que la estimulación de TLRs con CpG ODN disminuyó el volumen tumoral y parece tener un efecto sobre la proliferación celular y que CpG ODN y R848 disminuye de forma significativa la expresión de MMP-3, pero no tienen efecto sobre la expresión de caspasa-3. Finalmente, la estimulación con CpG ODN y R848 no tuvo un efecto significativo sobre la expresión de MMP-2 y MMP-9.

# I. INTRODUCCIÓN

## i. Epidemiología del cáncer

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define al cáncer como: “término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo.” Es la segunda causa de muerte y una de las enfermedades con mayor impacto social y económico en el mundo [1]. Tan sólo en el 2018 la OMS reportó que casi el 70% de las defunciones son de países de ingresos medios y bajos, entre ellos México [1]. En 2017 la Secretaría de Salud nombró al cáncer como la tercera causa de muerte en México y reportó que el 30% de los tipos de cáncer que presenta la población, están asociados al estilo de vida, el cual incluye: tabaquismo, alcoholismo, sedentarismo y mala alimentación, principalmente [1,2]. Y aunque en algunos casos es prevenible, la detección en una fase avanzada, la falta de diagnóstico y tratamiento son problemas frecuentes que contribuyen al aumento de defunciones [1,2].

El Global Cancer Observatory (GCO) estimó que hay 18,078,957 nuevos casos de cáncer en el mundo, de los cuales 272,603 son en una población joven de 0-19 años y de estos, el 11% son tumores del sistema nervioso central (SNC) [3]. Comparados con otros tumores, los tumores de SNC son poco frecuentes en adultos, pero representan uno de principales tipos de cáncer con mayor mortalidad en sujetos menores de 19 años, con una incidencia ligeramente mayor en el sexo masculino [3-5].

Los tumores del SNC forman parte de un grupo heterogéneo de neoplasias benignas y malignas, con más de 100 subtipos histológicos que abarcan desde la medula espinal, hasta el cerebro [4]. La etiología aun es desconocida, pero se ha asociado a mutaciones acumulativas consecuencia de agentes biológicos, químicos y/o físicos que dañan el DNA y actúan como carcinógenos [5]. Sólo el 5% de los casos parecen tener predisposición genética, concretamente síndromes hereditarios [5].



Los tumores del SNC más frecuentes en niños son: los astrocitomas, gliomas, tumores de células germinales, los endimomas y el meduloblastoma [6].

## **ii. Meduloblastoma**

El meduloblastoma es un tumor cerebral maligno, se ubica en el cerebelo y es más común en infantes y niños [7]. Es más recurrente en varones y tiene una gran propensión a invadir tejidos adyacentes y a la diseminación distante a través del líquido cerebroespinal [7]. Supone el 15-20% de los tumores del SNC y los síntomas clínicos incluyen vómito, cefalea, alteraciones del equilibrio, entre otros. La gravedad de estos dependerá de la localización del tumor y la presión que este ejerza sobre el resto del cerebro [7].

El meduloblastoma es una enfermedad heterogénea debido a que en el tejido tumoral se han encontrado diferentes marcadores genéticos, transcripcionales y características histológicas, que además de complicar su clasificación, impiden el desarrollo de terapias eficaces y funcionales en contra del tumor [8, 9]

La OMS clasificó a los meduloblastomas en cinco variantes histológicas: clásico; desmoplásico nodular; nodularidad extensa; anaplásico y células grandes. Se ha demostrado que el meduloblastoma desmoplásico tiene mejor pronóstico, mientras que los anaplásicos y células grandes son los de peor pronóstico en niños mayores a 3 años [8]. No obstante, la clasificación histológica no refleja la heterogeneidad dentro de un tumor. Por ello, en la práctica clínica se utiliza la clasificación molecular [8]. La clasificación molecular se sustenta en la biología y genética del tumor, sus alteraciones cromosómicas y perfiles de mutación [8]. Esta clasificación divide la enfermedad en cuatro subtipos: Wingless-related integration site (Wnt); Sonic Hedgehog (SHH); Grupo 3 y Grupo 4 [8].

Las diferencias entre cada grupo son de gran importancia clínica [8]. Por ejemplo, los tumores del grupo Wnt tiene el índice de supervivencia mayor entre los cuatro de hasta el 90%, mientras tanto los del grupo 3 son los de peor pronóstico con una supervivencia del 50% aun con tratamiento [8]. Los tumores SHH y del grupo 4

tienen un pronóstico intermedio con un índice de supervivencia del 75% aproximadamente [8].

## **ii. a Diagnóstico, tratamiento y supervivencia del meduloblastoma**

En la práctica clínica, se asignan los tratamientos de acuerdo a la clasificación, pronóstico y riesgo clínico de los pacientes, por ello la clasificación es crucial en esta enfermedad [8]. La caracterización de los tumores considera la edad del paciente, cantidad de tumor residual post-operación y el grado de diseminación en el momento del diagnóstico [10]. El diagnóstico se realiza considerando los signos y síntomas del paciente y mediante estudios de imagen, como tomografía computarizada y resonancia magnética [10]. En algunos casos, también se utiliza la punción lumbar para determinar si existe diseminación del tumor hacia la medula espinal y la clasificación tumoral se realiza mediante biopsias únicas, que aunque sirven para clasificar el tumor y elegir la intensidad del tratamiento, la heterogeneidad espacial inherente al tumor puede llevar a clasificaciones erróneas o a la mala elección de un tratamiento que sólo podría estar dirigido a una pequeña porción del tumor [9]. En consecuencia, uno de los inconvenientes del tratamiento es que no se toma en consideración la heterogeneidad del meduloblastoma, sólo se consideran los resultados de la biopsia, la cual sólo representa una pequeña fracción del tumor [9].

El tratamiento actual de meduloblastoma combina la resección quirúrgica con radiación craneoespinal y quimioterapia [10]. Sin embargo, el tratamiento quirúrgico genera secuelas neurológicas, cognitivas y endocrinológicas, incluyendo retraso mental, deficiencia de la hormona de crecimiento, problemas visuales y auditivos, en el 80% de los supervivientes [10, 11].

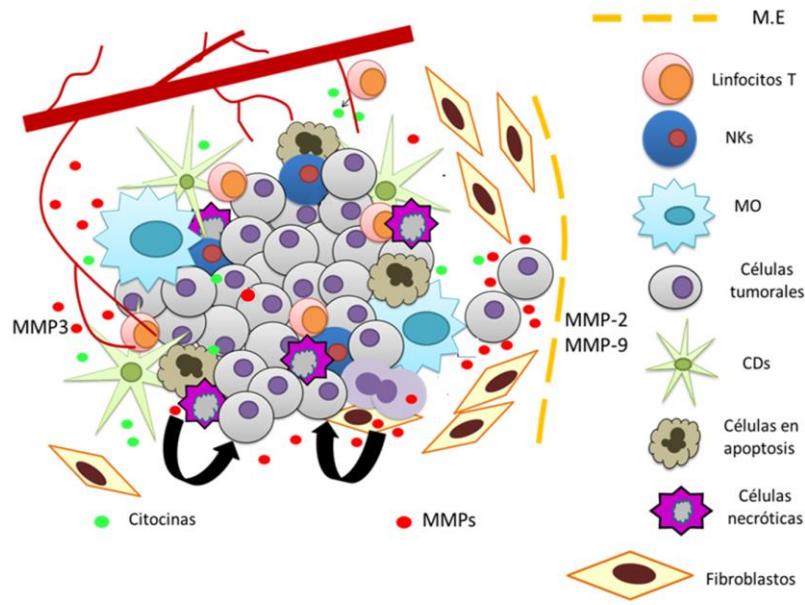
En las últimas décadas la supervivencia de los pacientes con meduloblastoma ha incrementado hasta un 85% debido al tratamiento estándar y a los protocolos de tratamiento que clasifican a los pacientes según la presencia o ausencia de metástasis en el momento del diagnóstico o de la enfermedad residual postoperatoria [11, 12]. Esto además de aumentar las tasas de supervivencia, ha

permitido reducir la exposición innecesaria de algunos pacientes a altas dosis de quimioterapia [12,13]. No obstante, el pronóstico es pobre para aquellos pacientes que presentan una recaída. Además los pacientes tienen secuelas a largo plazo y los efectos secundarios del tratamiento reducen su calidad de vida considerablemente [9, 12, 13].

### **iii. Microambiente tumoral y tumorigénesis.**

Los tumores están rodeados por células, tejidos y diferentes sustancias, donde las células tumorales crecen, a esto se ha denominado microambiente tumoral [14]. El microambiente tumoral está constituido por elementos celulares (células tumorales, elementos del sistema inmunológico, fibroblastos, células epiteliales, etc.) y por componentes no celulares como la matriz extracelular (ECM) y metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs), entre otros. Todos estos elementos interactúan entre sí y contribuyen a la tumorigénesis (**Fig. 1**). Por ejemplo, moléculas de las células tumorales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor estimulante de colonias 1 (CSF-1) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) promueven el crecimiento de fibroblastos, células endoteliales y macrófagos, los cuales son esenciales para supervivencia tumoral [15].

También, se ha demostrado que el estado del microambiente tumoral es crítico en la evolución y pronóstico del cáncer ya que puede ayudar a proteger al individuo contra la tumorigénesis e invasión de células tumorales [14]. Sin embargo, también puede promover la evolución y avance de la enfermedad [14]. Por ejemplo, dentro del microambiente tumoral existe una subpoblación de fibroblastos asociados a cáncer (CAFs, por sus siglas en inglés) que tienen un impacto significativo en el pronóstico del cáncer mediante la producción de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento similar a insulina II (IGF-II), el cual actúa como un potente mitógeno. También, se ha comprobado que estos inducen angiogénesis, fibrosis, producción de citocinas inmunosupresoras como TGF- $\beta$  y la proliferación celular tumoral que inducen el crecimiento del tumor y empeoran el pronóstico de la enfermedad [15-17].



**Figura 1. Representación gráfica del microambiente tumoral.** El microambiente tumoral está compuesto de tres elementos principales: células tumorales, elementos del sistema inmunológico y células estromales. Todos los elementos interactúan entre sí y contribuyen a la tumorigénesis. MMPs – metaloproteasas; CDs - células dendríticas; MO – macrófago; NK – natural killer; ME – matriz extracelular.

El microambiente tumoral difiere del ambiente de un tejido sano, a nivel de oxígeno, pH, estado nutricional de las células, arquitectura del tejido y la composición de la matriz extracelular (**Tabla 1**) [15]. El microambiente de un tejido sano generalmente no permite el desarrollo y crecimiento del tumor, a diferencia del microambiente tumoral [15].

Las células presentes en el microambiente tumoral se dividen de una forma no regulada, como resultado de las mutaciones que van acumulando, presentan diferencias en el tamaño, forma y membrana, por lo que el tejido se observa desorganizado e irregular [18]. Asimismo, las células con elevada tasa de proliferación requieren mayores cantidades de oxígeno y energía. En consecuencia, las células tumorales sobreactivan un proceso metabólico llamado glucólisis, cuyos productos (en presencia o ausencia de oxígeno) son moléculas de lactato,  $\text{CO}_2$  y agua, las cuales son responsables de la acidosis del

microambiente tumoral que resulta en daño tisular por la muerte de células sanas e inflamación [16, 19].

La inflamación es una característica de los tejidos con cáncer, es provocada por las interacciones entre las células infiltradas (macrófagos, linfocitos T, NKs, etc.) y las células cancerosas. El objetivo principal de la inflamación es eliminar células malignas, microorganismos invasores y tejidos dañados, sin embargo en el contexto del microambiente tumoral, la inflamación crónica en el cáncer tiende a generar un microambiente inmunosupresor que promueve el desarrollo del tumor [20]. Por ejemplo, los macrófagos reclutados e infiltrados en el tumor pueden polarizarse a un fenotipo M1 o M2 dependiendo del perfil de citocinas al que estén expuestos; mientras que el fenotipo M1 ejerce un efecto antitumoral por medio de sus efectos citotóxicos y la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , los macrófagos M2 promueven el desarrollo del cáncer generando un microambiente inmunosuprimido con la producción de IL-10 y TGF- $\beta$ , las cuales inhiben las funciones de las células T [16, 20].

La interacción entre el microambiente tumoral y la masa tumoral va a determinar si el tumor primario es erradicado o se produce metástasis [21]. Bajo esta premisa, el microambiente tumoral también puede dar origen a respuestas terapéuticas, esto justifica la tendencia actual de dirigir las nuevas terapias contra los componentes del microambiente, como algunos elementos del sistema inmunológico [21]. Por ejemplo, dentro del microambiente la activación de receptores tipo Toll presentes en macrófagos y células dendríticas puede generar respuestas anti-tumorales caracterizadas por el reclutamiento y activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y NKs [22].

La matriz extracelular (ECM) también juega un papel importante en el pronóstico del tumor (**Figura 1**). La ECM es una estructura tridimensional compuesta de colágeno, elastina, ácido hialurónico, fibronectina y glicoproteínas que rodea a las células y les brinda las condiciones necesarias para vivir en condiciones normales, esto también incluye a las células tumorales en condiciones de enfermedad, pero en este estado la ECM se encuentra constantemente en remodelación por efecto de la inflamación, el daño tisular y la proliferación celular exacerbada [15, 23].

La invasión, metástasis y angiogénesis, son mediadas en parte por proteínas presentes tanto en el tejido sano, como en la EMC del microambiente tumoral, llamadas metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) [24]. Las MMPs son enzimas proteolíticas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  involucradas en procesos fisiológicos como organogénesis, remodelación tisular, proliferación, angiogénesis, movilidad celular y apoptosis [24]. Todas las MMPs son producidas como proenzimas y requieren de una escisión proteolítica para activarse, es decir son zimógenos. Las MMPs pueden ser reguladas por inhibidores endógenos y a nivel transcripcional [25].

Se han descrito 23 MMPs en humanos y a cada una de las enzimas se le asignó un número (MMP-1, MMP-9, etc.). Estas pueden degradar proteínas de matriz extracelular. También son parte de procesos patológicos como la artritis, neurodegenerativos y cáncer [24, 25]. Por ejemplo, cuando las MMPs degradan las uniones intercelulares y la EMC pierde sus características adhesivas, esto resulta en la infiltración y migración de las células malignas hacia otros tejidos generando metástasis y angiogénesis [26].

**Tabla 1. Diferencias entre el tejido sano y el microambiente tumoral.**

<b>Característica</b>	<b>Tejido sano</b>	<b>Microambiente tumoral</b>
<b>Arquitectura del tejido</b>	Normal	Anormal
<b>Inflamación crónica</b>	No	Si
<b>Macrófagos</b>	Normales	Asociados a tumor
<b>Inmunidad contra tumor</b>	Anti-tumoral	Inmunosupresora
<b>Nivel de oxígeno</b>	Normoxia	Hipoxia
<b>pH</b>	~ 7.4	~ 6.7- 7.1
<b>Matriz extracelular</b>	Homeostasis	Remodelada y fibrosis
<b>Estado nutricional</b>	Normal	Deficiente

Modificada de Zheng y Gao, 2019 [16].

#### **iv. Inmunidad innata**

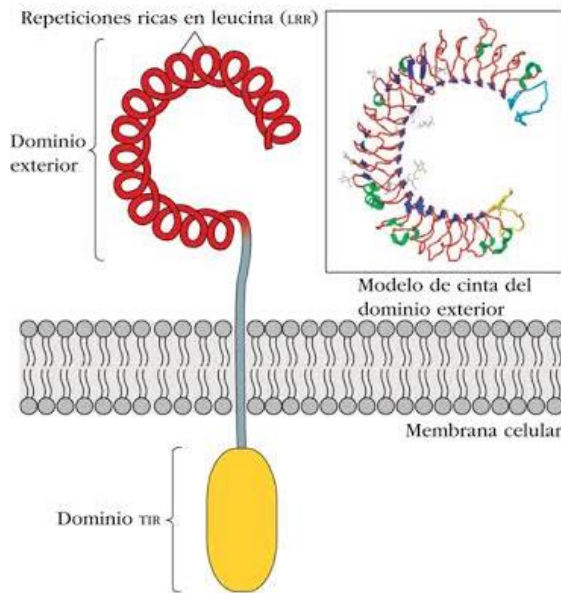
El sistema inmunológico es el conjunto de órganos, células, factores humorales y citocinas que se encarga de proteger al organismo. Se divide en inmunidad innata e inmunidad adaptativa [27]. La inmunidad innata es la primera barrera de defensa en contra de cualquier agente patógeno. Es una respuesta rápida que ocurre a minutos u horas después de la agresión y esta no genera memoria inmunológica [27]. Por otra parte, la inmunidad adaptativa es antígeno-específica, ocurre días después de la agresión y tiene la capacidad de generar memoria inmunológica, lo cual permite al huésped tener una respuesta inmunológica más rápida y eficiente en la exposición posterior al antígeno [28].

La inmunidad innata está comprendida por tejidos y células que expresan receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) [29, 30]. Los PRRs son una familia de receptores que incluyen a los receptores tipo RIG-I (RLRs), receptores tipo NOD (NLRs), receptores de lectina tipo C (CLR) y a los receptores tipo Toll (TLRs). Estos receptores reconocen secuencias moleculares altamente conservadas, llamadas patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs), así como moléculas endógenas llamadas patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) [30, 31]. La activación de estos receptores conducirá a la expresión de mediadores inmunológicos que coordinan la eliminación de patógenos, células infectadas o células tumorales [29-31].

##### **iv. a. Receptores tipo Toll**

Los TLRs son glicoproteínas integrales transmembranales de tipo I caracterizadas por dos dominios, uno citoplasmático similar al receptor de interleucina 1 (IL1R) llamado Toll/IL-1 receptor o por sus siglas en inglés TIR, encargado de iniciar la cascada de señalización cuando un receptor es activado [29]. El segundo dominio es extracelular y está caracterizado por repeticiones ricas en leucina, también llamado dominio LRR, el cual reconoce ligandos específicos (**Fig. 2**) [29]. Los TLRs se sintetizan en el retículo endoplásmico, luego son llevados al aparato de

Golgi donde son reclutados a la membrana celular o a los compartimientos celulares como los endosomas [30].



**Figura 2. Estructura del receptor tipo Toll (TLR).** Los TLRs tienen un dominio extracelular que reconoce ligandos específicos a través del dominio LRR. Además, poseen un dominio TIR que se une a proteínas adaptadoras para iniciar la cascada de señalización correspondiente. (Owen, J et al. Kuby Inmunología [Libro] 7<sup>a</sup> ed. Pág. 156. 2014 [30]).

Hasta ahora se han identificado 13 TLRs en mamíferos, 10 de ellos en humanos. El TLR11 se encuentra presente como una proteína no funcional en humanos, mientras que el TLR12 y TLR13 no están en ninguna célula humana [29, 31]. Cada uno tiene ligandos específicos y se localizan en la membrana plasmática o en los endosomas dentro de la célula (**Tabla 2**) [32]. Por otro lado, los TLRs están expresados en células del sistema inmunológico como células dendríticas y macrófagos, pero también se expresan en células no inmunes. Por ejemplo, en células endoteliales, epiteliales y en células tumorales [29, 31].



**Tabla 2. Receptores tipo Toll: localización y ligandos.**

Receptor	Localización celular	MAMPS reconocidos	DAMPS reconocidos
<b>TLR1/ TLR2</b>	Membrana plasmática	Ácido lipoteicoico, peptidoglicano (bacterias Gram +) y zymosan (fungi), entre otros.	Biglicano, proteínas de choque térmico, miosina, cristales de urato, entre otros.
<b>TLR2/ TLR6</b>	Membrana plasmática	Diacil lipoproteínas (micobacterias), mucina (protozoa), zymosan (fungi), PAM <sub>2</sub> CSK4 y FSL-1 (ligandos sintéticos).	TLR6: proteoglicanos (versican)
<b>TLR3</b>	Endosoma	dsRNA, RNAvirus, poly(I:C) (ligando sintético).	mRNA de células necróticas,
<b>TLR4</b>	Membrana plasmática/ endosoma	Lipopolisacárido, algunas proteínas virales.	Fibronectina, CD138, ácido hialurónico, entre otros.
<b>TLR5</b>	Membrana plasmática	Flagelina (bacterias)	HMGB1
<b>TLR7</b>	Endosoma	Imidazoquinolinas, imiquimod, resiquimod/R848 (agonistas sintéticos) RNA viral (influenza), ssRNA sintéticos (virus y bacteria).	ssRNA, entre otros.
<b>TLR8</b>	Endosoma	Imidazoquinolinas, RNA sintético, imiquimod, resiquimod/R848 (agonistas sintéticos).	ssRNA, microRNA, , entre otros.
<b>TLR9</b>	Endosoma	Oligonucleótidos CpG, dsDNA, hemozoina (parásitos).	DNA propio, HMGB1, Oligonucleótidos CpG.
<b>TLR10</b>	Membrana plasmática/ endosoma	Desconocido	Desconocido
<b>TLR11</b>	Endosoma	Profilina de <i>T. gondii</i>	Desconocido

Modificada de Braunstein, Kucharczyk, & Adams (2018) [32, 33].

#### **iv. b. Señalización por Receptores tipo Toll**

Los TLRs son fundamentales para la respuesta inmune innata a través de la interacción con PAMPs y DAMPs [30]. La unión de un ligando específico al dominio LRR del receptor derivará principalmente en la activación de las vías de señalización de NF- $\kappa$ B y la vía de las MAP cinasas [34]. Esto puede promover la proliferación celular, producción de citocinas, enzimas y otros mediadores de la respuesta inmunológica, los cuales tienen impacto sobre la patología y pronóstico de cualquier enfermedad, incluido el cáncer [29, 35]. El tipo de señal generada dependerá de la interacción ligando-receptor, la naturaleza del ligando, la localización de los receptores y el microambiente en el momento de la unión [30].

La interacción también va a generar que los receptores se dimericen a través de sus dominios LRR. En la mayoría de los casos, los TLRs se dimerizan con una subunidad de sí mismos formando homodímeros, sin embargo, hay excepciones como el TLR2 que forma heterodímeros con TLR1 y TLR6 [30, 36, 37]. La dimerización permite el reclutamiento de proteínas adaptadoras como MyD88, TRIF, TIRAP/MAL o TRAM las cuales inician vías de transducción de señales que culminan en la activación de factores como NF- $\kappa$ B, factores de regulación de interferón (IRFs) o MAP cinasas que regulan la respuesta inmune, como la producción de citocinas, moduladores inmunes, apoptosis y la presentación de antígeno [36, 38]. La señalización de los TLRs es dependiente de la proteína adaptadora MyD88. No obstante, el TLR3 se une a otra proteína adaptadora denominada TRIF y su señalización es independiente de MyD88 [38]. El TLR4 es un caso especial en cuanto a la señalización, ya que puede unirse tanto a MyD88 (cuando se encuentra en la membrana plasmática) como a TRIF (cuando está en endosomas) [30, 37].

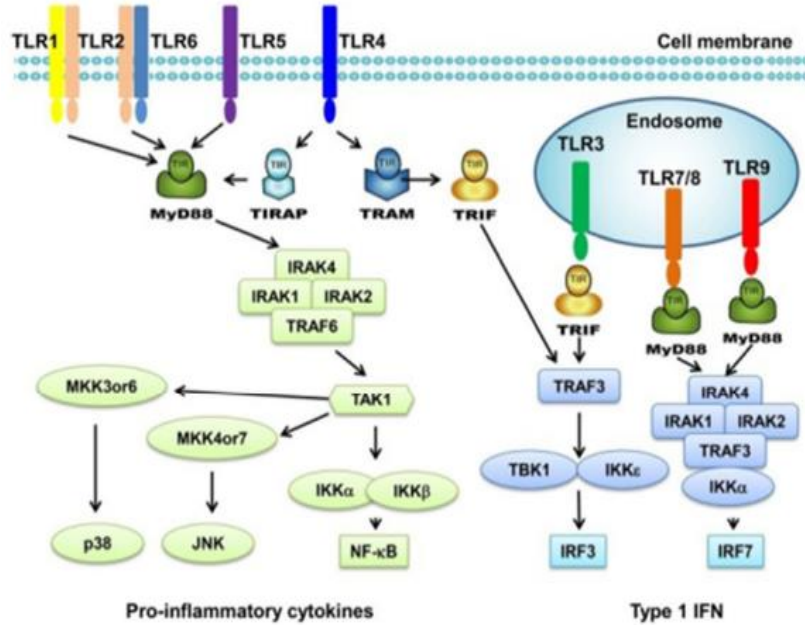
### **Vía dependiente de MyD88**

En los TLRs de membrana plasmática (TLR1, TLR2, TLR4-TLR6), MyD88 recluta y activa diferentes proteínas cinasas IRAK, que se unen a TRAF6, activándolo [36, 38]. TRAF6 ubiquitina a las proteínas TAB y NEMO, lo que inicia la activación de TAK1, que posteriormente fosforila al complejo IKK (cinasa de I $\kappa$ B). La IKK activada fosforila al inhibidor I $\kappa$ B de NF- $\kappa$ B, lo que libera a este factor para que entre al núcleo y active la expresión de genes [30, 37, 38]. TAK1 puede desempeñar un papel dual en la cascada de señalización, además de activar la vía de NF- $\kappa$ B, también activa la vía de las MAPK cinasas que dan lugar a la activación de otros factores de transcripción como c-Fos y c-Jun, que componen el dímero de AP-1 [30, 37, 38].

Los TLR3, TLR7-TLR9 son endosomales y activan a factores como IRF además de NF- $\kappa$ B y MAPK. Cuando la vía de IRF es activada por estos receptores, el complejo MyD88/IRAK4/TRAF6 activa a un complejo compuesto por TRAF3, IRAK1 e IKK $\alpha$ , lo que resulta en la fosforilación y traslocación nuclear de IRF7 (**Fig. 3**) [30, 36]. Cada factor de transcripción activado se encarga de la expresión de genes específicos como la secreción de quimiocinas, péptidos antimicrobianos y citocinas pro-inflamatorias como IL-6, TNF- $\alpha$ , INF- $\alpha$ , INF- $\beta$  e IL-1 $\beta$  [36, 38].

### **Vía independiente de MyD88**

En esta vía se recluta la molécula adaptadora TRIF en lugar de MyD88 [36, 38]. TRIF activa y recluta a TRAF6, el cual inicia los mismos pasos que la vía dependiente de MyD88. TRIF también activa a TRAF3 y al complejo de TBK1 e IKK $\epsilon$ , el cual fosforila y activa a IRF7 e IRF3, estos se dimerizan y se transportan hacia el núcleo al igual que NF- $\kappa$ B y AP-1 induciendo la transcripción génica (**Fig. 3**) [36].



**Figura 3. Vías de señalización de TLRs.** La vía de señalización que sea activada dependerá del tipo de ligando y el receptor. La transcripción génica regula la proliferación, diferenciación, apoptosis, producción de citocinas, entre otras funciones de la célula. (Refat EZ, S. et al. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview Bulletin of the National Research Centre [Artículo] 43:187 2019 [39])

#### v. Relación sistema inmunológico-cáncer

Las células tumorales son células propias y pueden expresar antígenos diferentes a los normales o expresarlos inapropiadamente, estos darán origen a péptidos que serán reconocidos por el sistema inmunológico. De acuerdo a su fuente, los antígenos tumorales se clasifican en: antígenos específicos para tumor y antígenos asociados con tumor [30].

Existe una relación estrecha entre el sistema inmunológico y el desarrollo del cáncer, este ejercerá tres funciones principales antes, durante y después de la enfermedad [40]:

1. Reconocimiento de antígenos de células malignas.
2. Detección y destrucción de células malignas a través de mecanismos efectores.
3. Desarrollo de memoria inmunológica.

El conjunto de estos procesos ha dado las bases para el paradigma conocido como, inmunoedición [40]. La inmunoedición se refiere al balance entre la vigilancia inmunológica, la capacidad del sistema inmunológico para reconocer y eliminar las células malignas en alguna de las etapas de la carcinogénesis, y la progresión del cáncer, esta se lleva a cabo en tres etapas: eliminación, equilibrio y escape [40, 41].

En la fase de eliminación el sistema inmunológico innato y adaptativo trabajan juntos para reconocer y erradicar las células transformadas que han escapado de los mecanismos naturales de la célula para suprimir el desarrollo de un tumor [36]. Las células transformadas que logran sobrevivir a la primera etapa, progresan a la fase de equilibrio, donde el crecimiento tumoral será limitado y con el tiempo podría detenerse [40, 41]. Finalmente, la constante presión del sistema inmunológico sobre las células tumorales, más la inestabilidad genética que estas poseen va a seleccionar clonas de células transformadas resistentes a los mecanismos de defensa de la respuesta inmunológica [40, 41]. La evasión inmunológica es una característica particular del cáncer y proporciona un nuevo enfoque para el desarrollo de inmunoterapias eficaces [42]. Sin embargo, comportamiento dual anti- y pro-tumoral en la inmunoedición, sumado a la inflamación inherente al microambiente tumoral, que incluye tanto elementos de la respuesta innata como de la respuesta adaptativa, demuestra la complejidad del uso de inmunoterapias para el tratamiento del cáncer [32].

Entre los componentes más importantes de la respuesta innata durante el desarrollo del cáncer se encuentran los TLRs. Existen diversos artículos que evidencian el comportamiento dual de estos receptores y su estrecha relación con el microambiente tumoral [32]. Por ejemplo, en cáncer de mama, la estimulación del TLR4 con LPS aumentó la secreción de IL-6 e IL-8 de las células tumorales, promoviendo así la tumorigénesis [42, 43]. En contraparte, la estimulación de TLR4 en glioblastoma con LPS causó la depleción de los tumores un modelo murino [44, 45]. Por otro lado, en cáncer gástrico, la estimulación de TLR5 con flagelina incrementó la producción de IL-8 y la proliferación de células tumorales,

pero en cáncer de seno, colorrectal y de pulmón se observó disminución del volumen tumoral [42]. Sin embargo, aún no está claro de qué dependen los efectos. Mientras, que el efecto pro-tumoral ha sido descrito como una consecuencia de la activación y expresión de TLRs directamente en células tumorales, otros han atribuido el efecto pro-tumoral a la expresión de TLRs en las células del infiltrado celular [44].

#### **vi. Muerte celular: apoptosis**

Los TLRs pueden inducir la muerte celular en un proceso llamado apoptosis. La apoptosis es un mecanismo no inflamatorio programado, de muerte celular que ocurre en condiciones fisiológicas y una de sus funciones principales es prevenir el cáncer [46, 47]. Al final de este proceso las células son fagocitadas y degradadas por macrófagos. Puede ser activada por distintas condiciones, como daño al DNA o señales de muerte producidas por células del sistema inmunológico en respuesta a células infectadas [46, 47].

Existen dos vías principales para inducir apoptosis, la vía intrínseca y la vía extrínseca, ambas se refieren al tipo de señal que las induce y son dependientes de caspasas [47]. Las caspasas (cistein-aspartil proteasas) son proteínas de familia de las proteasas que escinden componentes celulares necesarios para la función celular, como las proteínas nucleares y del citoesqueleto; se conocen 11 caspasas en ratón y 13 en humanos. Son sintetizadas como zimógenos o pro-caspasas y deben ser sometidas a un rompimiento proteolítico para dar lugar a su forma activa, también llamada caspasa [46, 47].

La vía intrínseca de apoptosis es regulada por la familia de proteínas de mitocondria BCL-2 y se activa cuando hay daño en el DNA, deficiencia de factores de crecimiento, exceso de  $Ca^{2+}$ , entre otros [46]. Estos estímulos conducen a la permeabilización de la membrana mitocondrial permitiendo que, sustancias como el citocromo c y el activador secundario de caspasa derivado de mitocondria (SMAC) sean liberadas, activándose así la vía de las caspasas [48].

Por otro lado, la vía extrínseca utiliza señales extracelulares para inducir apoptosis [48]. Los ligandos de muerte celular como ligando de Fas (FasL), ligando inductor de apoptosis asociado a TNF (TRAIL) y factor de necrosis tumoral (TNF), se unen a los receptores de muerte celular de la familia del receptor de TNF (TNFR, DR) [48, 49]. Después, las pro-caspasas 8 y 10 se unen a proteínas adaptadoras formando el complejo de señalización inductor de muerte (DISC) y son activadas por el mismo [46]. Las caspasas efectoras -3, -6 y -7 también son activadas e inician con el rompimiento de proteínas, llevando a la muerte celular [48].

Las caspasas pueden dividirse en tres grupos diferentes de acuerdo a su función, estos son: iniciadoras de apoptosis (caspasa-2, -8, -9, -10); efectoras (caspasa-3, 6, 7); y mediadores inflamatorios (caspasa-1, -4, -5, -12, -14) [45, 47]. Todas las caspasas efectoras son activadas a través de las iniciadoras de apoptosis [48]. Particularmente, la caspasa-3 además de ser una enzima clave en la muerte celular donde convergen ambas vías, también lo es en el desarrollo del cerebelo y neuronal normal [48, 51].

Cuando las células pierden el control sobre la apoptosis, tienen un ciclo de vida más largo, lo que conlleva a la acumulación de mutaciones y un posible incremento en la capacidad de invasión, angiogénesis, alteraciones en la diferenciación y alteración de la proliferación celular [48].

Una de las alternativas propuestas para tratar el cáncer está enfocada en detener o controlar la proliferación desmedida de las células malignas mediante su propio mecanismo de muerte. Esta estrategia puede ser usada en cualquier tipo de cáncer y parece ser el tratamiento no quirúrgico más efectivo [48].

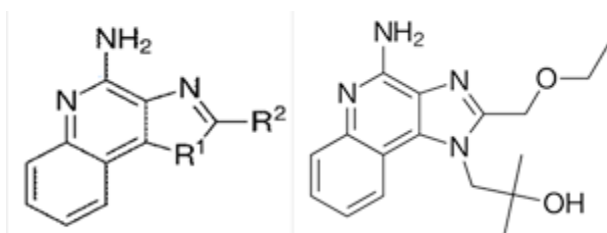
## II. ANTECEDENTES

Los TLRs median varias funciones inmunológicas y están presentes en diferentes tipos celulares. Estos receptores pueden generar un efecto pro- o anti-tumoral, dependiendo del TLR, el infiltrado celular presente en el tumor y el subtipo de cáncer [44].

Se ha demostrado que la activación de los TLRs mediante ligandos específicos pueden tener efecto anti-tumoral actuando directamente sobre las células del infiltrado celular o directamente en las células tumorales, ya sea mejorando la respuesta inmunológica sobre el tumor y/o induciendo apoptosis de las células tumorales [44].

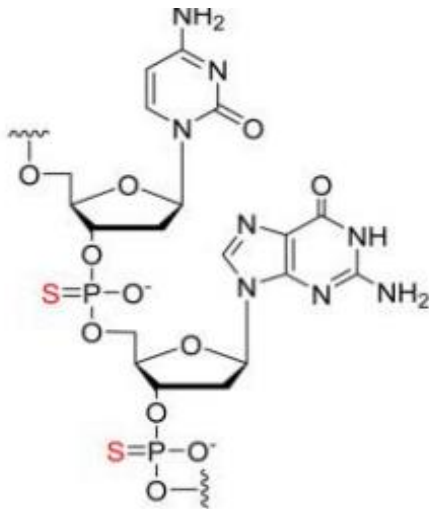
Los agonistas sintéticos de los TLRs son candidatos a ser utilizados en concomitancia con quimioterapéuticos en el tratamiento del cáncer [51]. Se ha descubierto que algunos agonistas de TLRs inducen una fuerte actividad antitumoral al activar al sistema inmunológico del huésped, permitiendo la eliminación de células malignas [51].

Se ha descrito que tanto el TLR7 y como el TLR8 reconocen imidazoquinolinas como el R848, que se asemeja a secuencias de ssRNA [42, 44]. Las imidazoquinolinas son moléculas orgánicas tricíclicas que poseen dos sitios de sustitución ( $R^1$  y  $R^2$ ) y tienen tanto efectos antivirales, como efectos anti-cáncer (**Fig. 4**) [52, 53]. Diversos estudios han demostrado que la estimulación del TLR7 con imidazoquinolinas aumenta la sensibilidad de las células cancerosas a ser destruidas por células efectoras citotóxicas [42, 44]. También, se ha demostrado que la activación de TLR7 a través de ligandos puede inducir lisis de células malignas en leucemia linfocítica [42, 44, 54].



**Figura 4.** Estructura de una imidazoquinolina y de Resiquimod (R848).





**Figura 5. Estructura de un CpG ODN.**

[Bremer, P. et al. *Injection Route and TLR9 Agonist Addition Significantly Impact Heroin Vaccine Efficacy. Molecular Pharmaceutics* [Artículo] 11, 1075-1080, 2014. [57].

Asimismo, el TLR9 reconoce dsDNA y análogos de estas secuencias como son los CpG ODN. Los CpG ODN son secuencias cortas sintéticas de DNA no metilado de cadena sencilla que contienen repeticiones de citosina y guanina (motivos CpG) similares a las repeticiones presentes en el DNA bacteriano, pero en vez de estar unidos por un enlace fosfodiéster, están unidos por un enlace fosforotioato que impide su degradación en la célula (**Fig. 5**) [55, 56]. Los agonistas de TLRs más usados en terapia son los CpG ODN, estos son capaces de activar la inmunidad innata y adaptativa, induciendo la producción de citocinas como interferones humanos tipo I (IFN) por células dendríticas, IL-6 e IL-10 por células B. También inducen la activación de células dendríticas, células B, monocitos, NKs y células T. Y pueden ejercer efectos antitumorales al inhibir la angiogénesis actuando a través del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) al bloquear la cascada de señalización y al usarse en conjunto con medicamentos anti-EGFR y anti-VEGF [44, 56].

Previamente, en nuestro grupo de trabajo se confirmó la expresión de TLR7, TLR8 y TLR9 en 56 biopsias de pacientes pediátricos con meduloblastoma por inmunohistoquímica (**Datos en proceso de publicación**). Este hallazgo es de gran importancia, ya que desde 2002 a la fecha, sólo se ha reportado formalmente la expresión de TLR2 y TLR3 en meduloblastoma [58].

Específicamente sobre tumores del sistema nervioso central se ha descrito que la estimulación del TLR9 con ODN 1826 induce apoptosis dependiente de caspasa-3 en gliomas y aumenta la supervivencia de ratones C57BL/6 con glioma intracraneal [55]. Del mismo modo, la administración parenteral de R848 fue efectiva para erradicar tumores establecidos de glioma en ratas, las cuales demostraron tener memoria inmunológica al presentar rechazo a un tumor secundario [59]. Además, el efecto antitumoral del R848 fue similar al combinar el tratamiento con ciclofosfamida, un medicamento oncológico [59]. En contraste, aquellas ratas sólo tratadas con ciclofosfamida no desarrollaron memoria inmunológica y no hubo rechazo del tumor secundario, además mostraron crecimiento del tumor primario, al ser expuestos a un segundo tumor [59]. De la misma forma, aquellas ratas que habían sido tratadas con R848 y ciclofosfamida, que inicialmente habían erradicado o disminuido el tumor primario, fallaron al rechazar el segundo tumor [59]. A pesar de los efectos antitumorales de R848 como agonista sintético de TLR7, Ruan et al. (2014) demostró que la activación de TLR7 con gardiquimod, otro agonista de TLR7, aumenta la expresión de MMP-9 en cáncer de páncreas [61].

En otro estudio, Grauer et al. (2014) encontró expresión de TLR5, TLR7 y TLR9 en células GL261 de glioma y demostró que una sola inyección intratumoral de CpG ODN 1668 inhibió el crecimiento y la proliferación celular del glioma [62]. El CpG ODN 1668 también eliminó el tumor intracraneal y aumentó la supervivencia de los ratones a más de 90 días [62]. Mientras tanto, la administración de R848 extendió la supervivencia de los ratones con glioma a más de 36.5 días lo cual fue menor a lo observado con el CpG ODN 1668 [62]. Antoine et al. demostró que ratas con glioma tratadas con una sola inyección de CpG ODN mostraron supervivencia a largo plazo (>90 días) y no presentaron tumor residual, a comparación de los controles no tratados que murieron a los 23 días y presentaron masa tumoral [63]. También demostró que los CpG ODN favorecen la generación de inmunidad a largo plazo y la supervivencia en ratas con dos tumores de glioblastoma separados, en los que sólo se trató uno de forma intratumoral [63]. Además encontraron mayor infiltración de linfocitos CD8<sup>+</sup>, macrófagos y NKs en los

tumores tratados con CpG ODN que en los controles. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el tratamiento con CpG ODN podría estar generando memoria inmunológica y podría mejorar el pronóstico del tumor al reclutar células del SI al tumor [63].

Wu et al. (2007) observó que la administración subcutánea de CpG ODN 2006 adicionado con lisado celular de glioma (línea celular GL261) en ratones con glioma, tiene un potente efecto antitumoral donde el 55% de los ratones se curaron; los ratones mostraron alta expansión de linfocitos T específicos contra células de glioma y un aumento de células dendríticas activadas [44, 64] En contraste, Ruan et al. (2014) observó que la activación de TLR9 en células de carcinoma de células escamosas con CpG ODN 2006 promueve su migración al aumentar la expresión, actividad y secreción de MMP-2 [61].

Los estudios reflejan que tanto la aplicación intratumoral, como la administración parenteral de agonistas sintéticos de TLR tienen efectos positivos sobre tumores del SNC. Sin embargo, los efectos pueden variar de acuerdo al tipo tumoral aumentando su complejidad de estudio. Por otra parte, los estudios también señalan que los agonistas sintéticos de los TLRs pueden ser utilizados en concomitancia con quimioterapia, resaltando su versatilidad y efecto antitumoral, siendo un área de estudio muy prometedora para el tratamiento del meduloblastoma.

### **III. JUSTIFICACIÓN**

El microambiente tumoral involucra una serie de interacciones entre la matriz extracelular, células estromales y elementos del sistema inmunológico como son los TLRs. Los TLRs son expresados en diferentes tumores y se ha demostrado que su activación con agonistas sintéticos puede tener un efecto pro- o antitumoral de acuerdo al receptor activado y al tipo de cáncer. La estimulación de estos receptores con agonistas sintéticos en células de glioma, astrocitoma, glioblastoma y microglia, así como en otros tipos de cáncer ha sido ampliamente estudiada y ha demostrado tener efectos sobre la proliferación, invasión, migración, angiogénesis y apoptosis de células malignas. Sin embargo, no se conoce la función ni el efecto de la activación de TLR7/8 y TLR9 con agonistas sintéticos específicos en el meduloblastoma. Además, el tratamiento de primera línea de este tumor genera en los pacientes secuelas neurocognitivas y neurosensoriales que disminuyen significativamente la calidad de vida de los pacientes. Por lo que la activación de TLR7/8 y TLR9 en meduloblastoma con agonistas sintéticos podría tener un efecto anti-tumoral que promueva la desaparición del tumor. En consecuencia, la siguiente investigación contribuirá a la exploración de nuevas terapias que permitan aumentar el índice de supervivencia y calidad de vida de los pacientes.

### **IV. HIPÓTESIS**

La activación intratumoral de TLR7/8 y TLR9 con ligandos sintéticos, tendrá un efecto anti-tumoral al disminuir la proliferación, la expresión de metaloproteasas y promover la muerte de las células tumorales.

## **V. OBJETIVO GENERAL**

- Determinar el efecto de la activación de TLR7/8 y TLR9 con ligandos sintéticos en un modelo murino de meduloblastoma sobre la proliferación, expresión de caspasa-3, MMP-2, MMP-3 y MMP-9.

## **VI. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar la expresión de TLRs en xenotrasplantes murinos de meduloblastoma.
- Determinar el efecto de la estimulación de los TLRs sobre la proliferación de células tumorales.
- Conocer el efecto de la estimulación de los TLRs sobre la expresión de caspasa-3.
- Establecer el efecto de la estimulación de TLRs sobre la expresión y actividad de MMP-2, MMP-3 y MMP-9.

## VII. METODOLOGÍA

### vii. a. Cultivo celular

Se utilizaron células DAOY (ATCC HTB-186<sup>TM</sup>) provenientes del cerebelo de un humano varón de 4 años con meduloblastoma desmoplásico. Las células se cultivaron en medio EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) con L-Glutamina (ATCC), penicilina, estreptomycin y amfotericina B (Gibco), complementado con 10% de suero fetal bovino a 37° C y CO<sub>2</sub> al 5% en incubadora. Las células se utilizaron a los 3 días de cultivo al sexto pase y se realizó el conteo con azul tripan en dilución 1:10 en una cámara de Neubauer.

### vii. b. Modelo murino de meduloblastoma

El experimento fue realizado en ratones desnudos (NU/NU) machos de 6-8 semanas de edad. Se administraron de forma subcutánea 400,000 células DAOY ATCC HTB-186 de meduloblastoma en el muslo derecho de los ratones (n=30). Semanalmente se llevó a cabo un control de peso y se midieron los tumores con un Vernier. Después del xenotrasplante, cuando los tumores alcanzaron un volumen de por lo menos 80 mm<sup>3</sup>, se dividió a los sujetos en tres grupos de estudio: controles (n=11), CpG ODN (n=12) y R848 (n=7). Entre la semana 12-14 los tratamientos se inyectaron de forma intratumoral de la siguiente forma: 200µL de agua inyectable a los controles, 5µg de CpG Oligonucleótido y 5µg de R848 (Resiquimod) respectivamente. Siete días después de la primera dosis, se administró la segunda dosis de la misma forma. Finalmente, una semana después de la segunda dosis, los ratones fueron sacrificados y los tumores extraídos (**Anexo I**). El volumen tumoral fue calculado utilizando las siguientes fórmulas:  $[(\text{diámetro})^2 * (\text{largo})/2]$  y  $[(4/3) * (3.1416) * (\text{diámetro}/2)^3]$ , para tumores no esféricos y tumores esféricos respectivamente.

De los 30 ratones a los cuales se midió volumen tumoral, 1 tumor no fue procesado para extracción de proteínas pero sí para inmunohistoquímica y sólo fueron procesados para extracción de proteínas 17 tumores: 6 controles, 5 tratados con CpG ODN y 6 tratados con R848. El resto aún no son procesados.

### **vii. c. Western Blot**

Las proteínas de los tumores fueron extraídas por maceración con CytoBuster™ Protein Extraction Reagent [MERK Millipore Cat. 71009], Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X) [Thermo Scientific™ Cat. 78446] y EDTA 0.5M [Thermo Scientific™ Cat. R1021] en frío. La concentración total de proteínas fue cuantificada con el equipo NanoDrop. Posteriormente las muestras fueron desnaturalizadas con  $\beta$ -mercaptoetanol y calor a 95°C durante 5 minutos. Las proteínas (70 $\mu$ g/pozo) se corrieron en geles de poliacrilamida al 15% y transferidas a membranas de nitrocelulosa a 300mA durante 2 horas en una cámara húmeda para Western Blot. El bloqueo se realizó con una solución de albúmina sérica bovina (BSA) o leche al 5% -según era el caso- en buffer de lavado [NaCl 8.76g/L, Trizma base 2.42g/L y Tween 0.1% a pH= 7.5] durante 1h a temperatura ambiente, en agitación constante. El anticuerpo primario se preparó en una disolución de BSA al 10%. Posteriormente, se agregó a la membrana. Se utilizaron anticuerpos contra PCNA [Abcam Cat. ab29 1:1000], TLR7 [Enzo Cat. ALX-210-874 1:500], TLR8 [Invitrogen Cat. MA5-16194 1:500], TLR9 [Enzo Cat. ADI-905730-100 1:500], MMP3 [Invitrogen Cat. MA5-17123 1:1000] y Caspasa-3 que también se une a pro-caspasa-3 [Santa Cruz Biotechnology Cat. 31A1067 1:2000]. El control de carga fue  $\beta$ -Actina [Abcam Cat. Ab179467 1:5000]. Las membranas se lavaron 5 veces durante 3 minutos cada uno, con buffer de lavado, antes de agregar el anticuerpo secundario conjugado a HRP. Los anticuerpos secundarios se prepararon en una disolución de BSA al 10% o leche al 10% -según era el caso-. Las bandas fueron reveladas con luminol quimioluminiscente en el fotodocumentador y analizadas en el programa ImageJ. Se realizaron dos experimentos independientes para cada proteína.

#### **vii. d. Inmunohistoquímica**

Los tumores extraídos fueron fijados en paraformaldehído 4% durante 4 días y después se colocaron en una solución de sacarosa al 30% con azida de sodio al 0.1%. Posteriormente, se realizaron cortes histológicos de 30µm de grosor en el criostato. Las secciones se lavaron con buffer de fosfatos PBS (1X) durante 10 minutos. Después se realizó la recuperación antigénica con un buffer de citratos 10mM pH=6,0 y posteriormente, las peroxidases endógenas fueron bloqueadas durante 15 min en agitación constante con Peroxidase-Blocking Reagent [EnVision™ Dako Cat. DM821]. Los lavados se realizaron con PBS-Tritón 0.3% durante 5 minutos. El bloqueo se llevó a cabo con PBS-Tritón 0.3% + BSA 1% durante 1 h a temperatura ambiente. Se agregó el anticuerpo primario en una disolución de BSA al 1% para identificar Ki67 [Abcam Cat. ab15580 1:200] y se incubó a 4°C durante toda la noche. Nuevamente se realizaron lavados y se agregó el anticuerpo secundario conjugado a HRP durante 2 h a temperatura ambiente en una disolución de BSA al 1%. Se añadió el sustrato de la enzima [diaminobencidina (DAB)] y se detuvo la reacción una vez que el color era evidente. Se realizaron lavados. Finalmente, se tiñeron los tejidos con hematoxilina y se fijaron. La cuantificación de células positivas se realizó mediante el programa ImageJ manualmente.



### **vii. e. Zimograma**

Las proteínas tumorales fueron extraídas y se corrieron en geles de poliacrilamida al 8% con gelatina porcina al 2%. Después, se lavaron los geles en agitación constante con Tritón al 2.5% durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con agua corriente hasta eliminar espuma. Posteriormente, los geles fueron incubados en buffer de incubación [Tris 50mM pH=7.4, NaCl 0.15M, CaCl 20mM y azida de sodio 0.02%] a 37°C por 48h. Luego, se tiñeron con Azul de Coomassie durante 30 minutos para revelar los sitios de proteólisis. De acuerdo a la visibilidad de las bandas, se hicieron lavados con una solución desteñidora [Glicerol 10%, ácido acético 10%, metanol 10%]. Finalmente, los geles fueron secados y analizados (**Anexo II**).

### **vii. f. Análisis Estadístico**

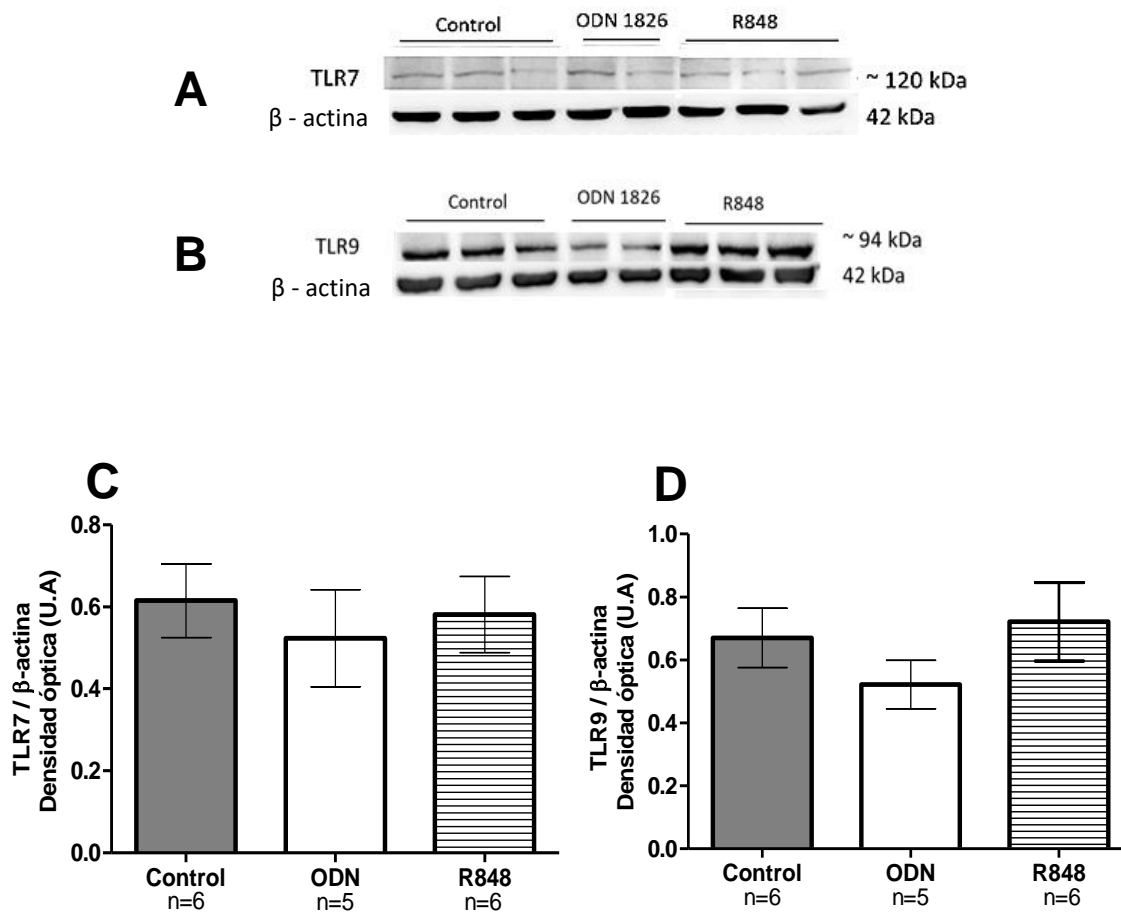
Los niveles de expresión de proteínas como PCNA, TLR7, TLR9, Pro-caspasa-3, Caspasa-3, MMP-2 y MMP-9 fueron analizadas con una prueba ANOVA de una vía y se consideró significativo un valor de  $p < 0.05$ . Los ensayos de expresión de Ki67, MMP-3 y los resultados de volumen tumoral se analizaron con una prueba de T no pareada o T pareada según era el caso, y se consideró significativo un valor de  $p < 0.05$ . Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas utilizando el programa GraphPad Prism 5.

## VIII. RESULTADOS

### viii. a. Expresión de TLR7, TLR8 y TLR9 en xenotrasplantes murinos de meduloblastoma

Inicialmente, fue necesario evaluar la presencia de los receptores TLR7, TLR8 y TLR9 en los tumores extraídos (**Anexo I**) y determinar si había diferencias de la expresión por el tratamiento. Para tal efecto, se extrajeron las proteínas de los tumores y se realizó western blot. Se observó expresión del TLR7 y TLR9 tanto en los tumores control como en los tratados con CpG ODN y R848 (**Fig. 6A, 6B**). Pero, no encontramos expresión del TLR8 en ninguno de los tumores bajo nuestras condiciones experimentales.

Posteriormente, se cuantificó la expresión de TLR7 y TLR9 en los tres grupos de estudio. Aunque los resultados no son estadísticamente significativos, la expresión relativa de TLR9 tiende a ser menor en aquellos tumores tratados con CpG ODN a comparación de los tumores control y los tratados con R848 (**Fig. 6C, 6D**).

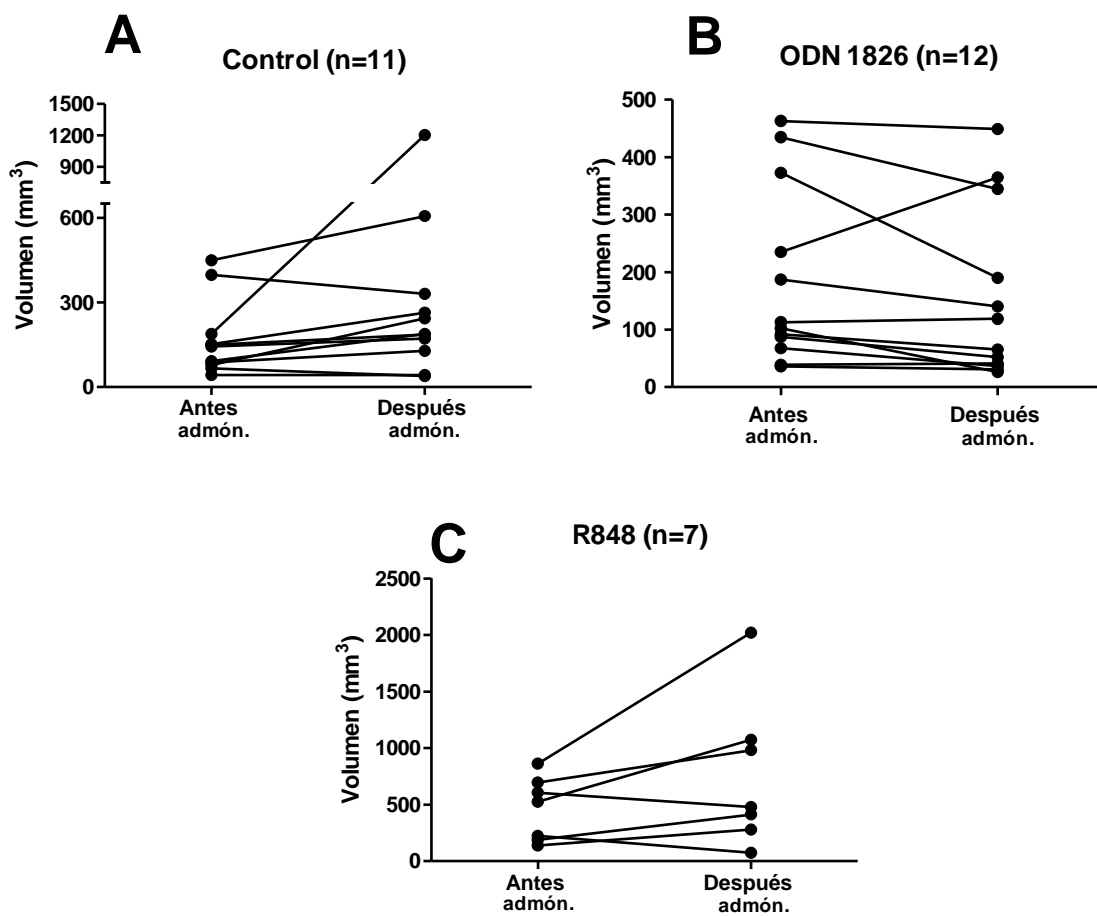


**Figura 6. Los xenotrasplantes subcutáneos de meduloblastoma expresan TLR7 y TLR9.** Imagen representativa de la expresión de TLR7 (A) y TLR9 (B) por western blot en xenotrasplantes murinos de meduloblastoma. Cuantificación de la expresión relativa de TLR7 (C) y TLR9 (D). Las barras representan el promedio de la expresión relativa de las proteínas con respecto a β-actina en los tumores ± SEM. U.A – unidades relativas.

### **viii. b. Efecto de la estimulación con CpG ODN y R848 sobre el volumen tumoral en xenotrasplantes murinos de meduloblastoma**

Una vez que determinamos la presencia de los TLR7 y TLR9, decidimos investigar el efecto de la estimulación con CpG ODN y R848 sobre el volumen tumoral.

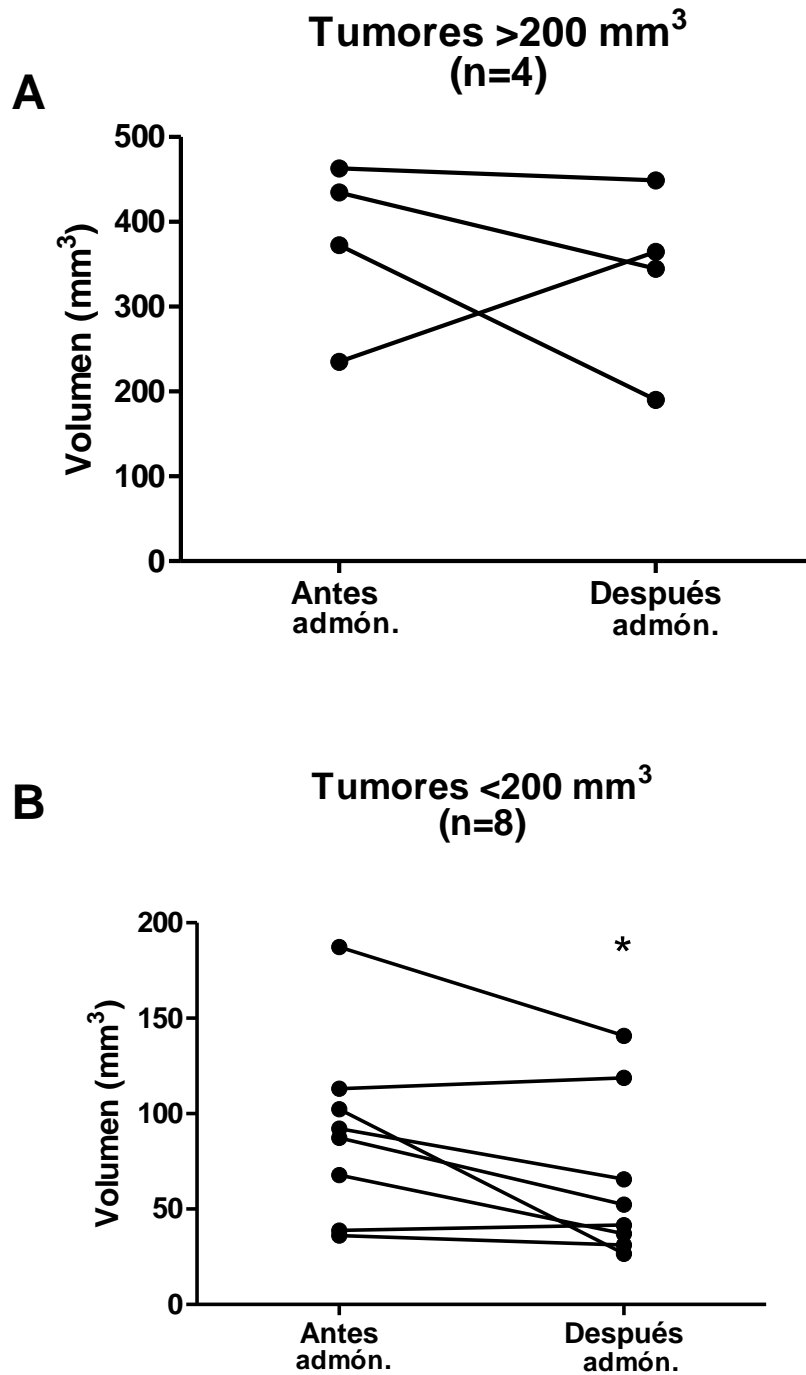
Al analizar los volúmenes tumorales, se observó que disminuyó en el 75% de los ratones tratados con CpG ODN, mientras la tendencia en el grupo control fue a la alta (**Fig. 7A, 7B**). Por otra parte, en el grupo tratado con R848 la disminución del volumen tumoral se observó en menos del 30% de los ratones (**Fig. 7C**). Aunque no son estadísticamente significativos, los resultados sugieren que el CpG ODN ejerce un efecto antitumoral mayor que el R848.



**Figura 7. Efecto del tratamiento con ligandos sintéticos de TLRs sobre el volumen tumoral de xenotrasplantes murinos de meduloblastoma.** (A) Volumen tumoral de animales administrados por vía intratumoral con agua inyectable (control); (B) tratados con CpG ODN y (C) tratados con R848.

Aproximadamente el 75% de los ratones tratados con CpG ODN disminuyeron de tamaño, por lo que analizamos si el tamaño inicial del tumor influye de alguna forma en el efecto del tratamiento.

Separamos los tumores tratados con CpG ODN en dos grupos, aquellos cuyo volumen inicial era mayor a 200 mm<sup>3</sup> y otro con tumores menores a 200 mm<sup>3</sup>. Se observó que los tumores con un volumen mayor a 200 mm<sup>3</sup> antes del tratamiento, no disminuyeron significativamente (**Fig. 8A**). En cambio, los tumores con un volumen menor a 200 mm<sup>3</sup> antes del tratamiento, disminuyeron significativamente su volumen después de ser tratados con CpG ODN (**Fig. 8B**). Este resultado indica que el tratamiento es efectivo en tumores de volumen inicial menor a 200 mm<sup>3</sup>, lo cual es positivo ya que el tratamiento con CpG ODN y R848 están pensados como tratamientos concomitantes con quimioterapia y radioterapia en tumores pequeños o residuales.



**Figura 8. Análisis del volumen tumoral de xenotrasplantes murinos de meduloblastoma tratados con CpG ODN. (A) Tumores con un volumen inicial mayor que 200 mm<sup>3</sup>. (B) Tumores con volumen inicial menor a 200 mm<sup>3</sup>. \*  $p < 0.05$  vs antes admón.**

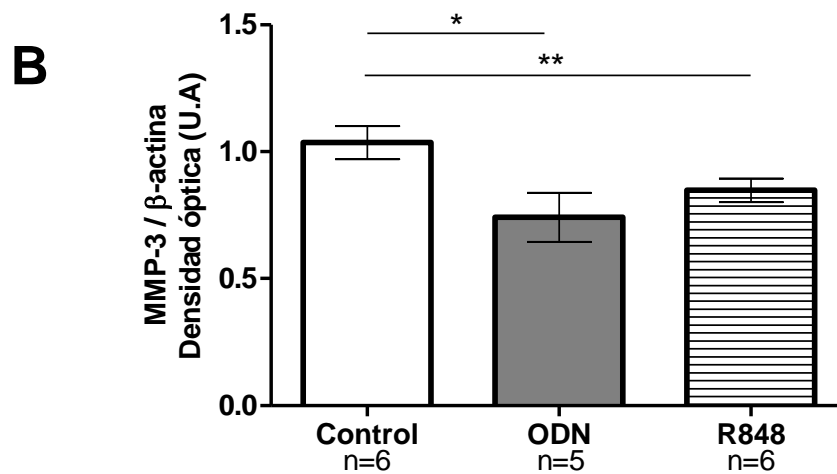
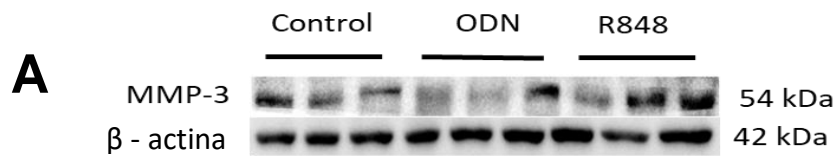
### **viii. c. La expresión de la proteína MMP-3 disminuye en los tumores tratados con CpG ODN y R848**

Considerando que el tratamiento con ambos agonistas de TLRs disminuye el volumen tumoral, se realizaron experimentos enfocados a conocer el o los mecanismos por los cuales llevan a cabo su efecto.

La angiogénesis es necesaria para el crecimiento y desarrollo tumoral, en este proceso está implicada la MMP-3. La MMP-3 es considerada un potencial marcador pronóstico de cáncer. Por ello, decidimos estudiar el efecto de la activación de los TLR7/TLR8 y TLR9 sobre la expresión de MMP-3 (**Fig. 9A**).

Encontramos que los tumores tratados con CpG ODN y R848 presentaron una disminución significativa con respecto a los tumores control (**Fig. 9B**). Y aunque no hay diferencias significativas entre ambos tratamientos, los resultados indican que la estimulación con estos ligandos tiene la capacidad de disminuir la expresión de la MMP-3, por lo que el tratamiento con CpG ODN y R848 podrían reducir la capacidad angiogénica del tumor.



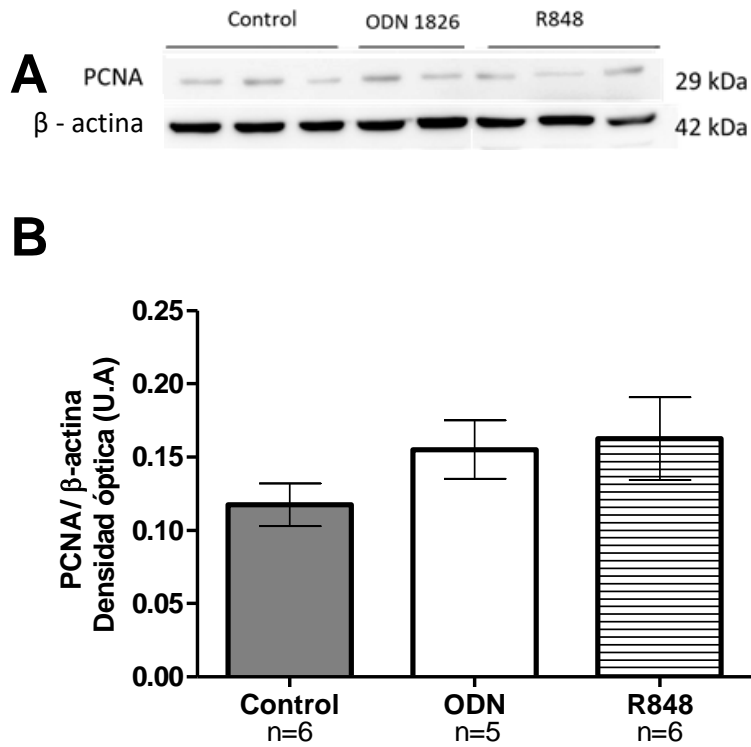


**Figura 9. Efecto de CpG ODN y R848 sobre la expresión de MMP-3 en xenotrasplantes murinos de meduloblastoma.** (A) Imagen representativa de la expresión de MMP-3 por western blot de dos geles. (B) Cuantificación de la expresión de MMP-3. Las barras representan el promedio de la expresión relativa de MMP-3 con respecto a  $\beta$ -actina en los tumores  $\pm$  SEM. Prueba de T no pareada. \*  $p < 0.05$ . U.A – unidades arbitrarias

#### **viii. d. Efecto del CpG ODN y el R848 sobre la proliferación celular tumoral en xenotrasplantes murinos de meduloblastoma**

Posteriormente, para determinar si existe una relación entre la disminución del volumen tumoral y la proliferación celular por la estimulación con CpG ODN y R848, realizamos un ensayo western blot para medir la expresión de PCNA, un marcador de proliferación muy utilizado para diagnóstico y pronóstico de cáncer **(Fig. 10A)**.

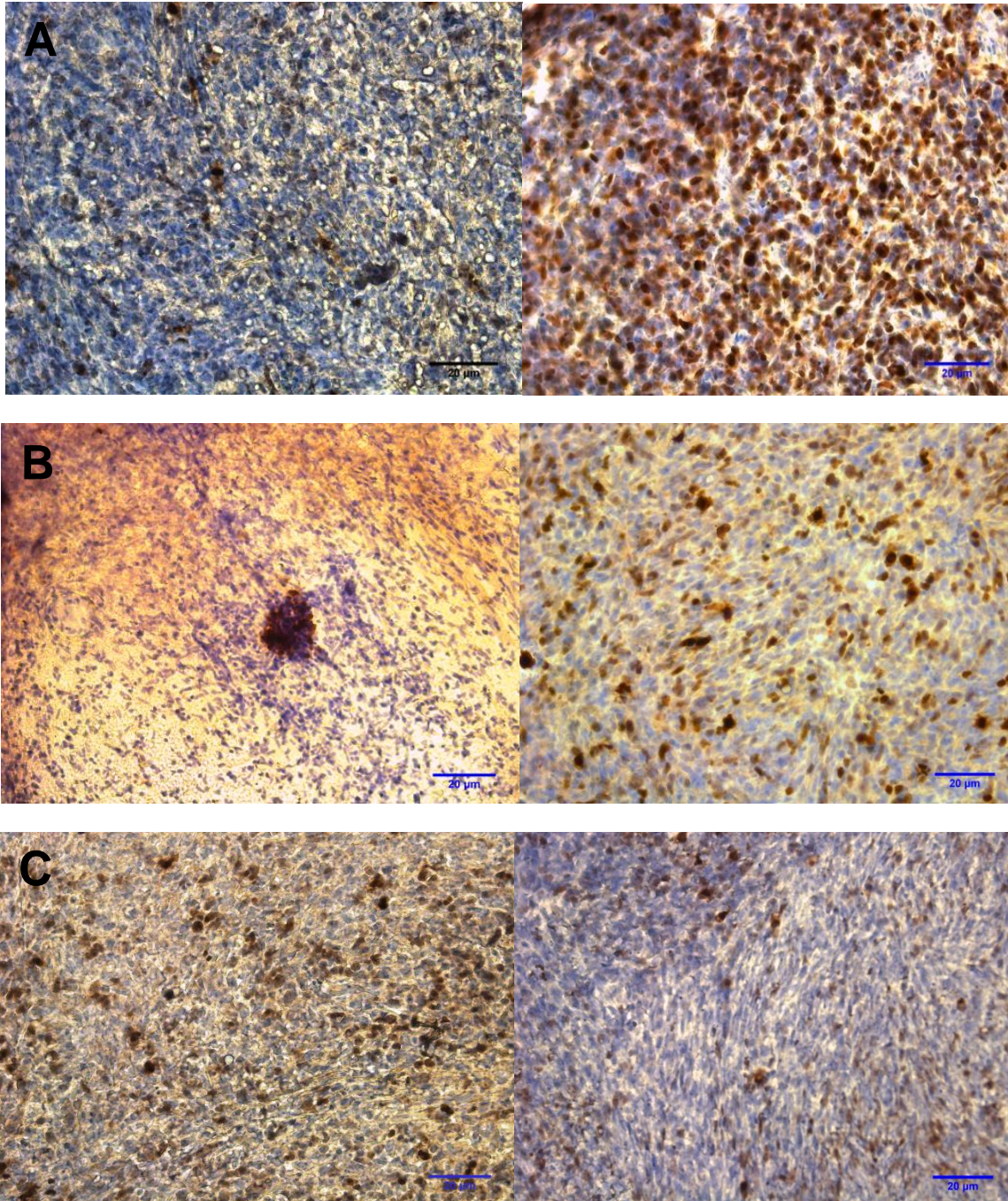
Aunque los resultados demostraron no ser estadísticamente significativos al compararlos con el grupo control, se observa una tendencia en los tumores tratados con CpG ODN y R848 a expresar PCNA en mayor cantidad **(Fig. 10B)**. Estos resultados sugieren que hay mayor proliferación tumoral en aquellos tumores tratados con agonistas sintéticos de TLRs. No obstante, es un resultado controversial con respecto a la disminución del volumen tumoral en los ratones administrados con CpG ODN y los controles. Por lo tanto, decidimos corroborar estos resultados empleando otro marcador de proliferación, la proteína Ki67.



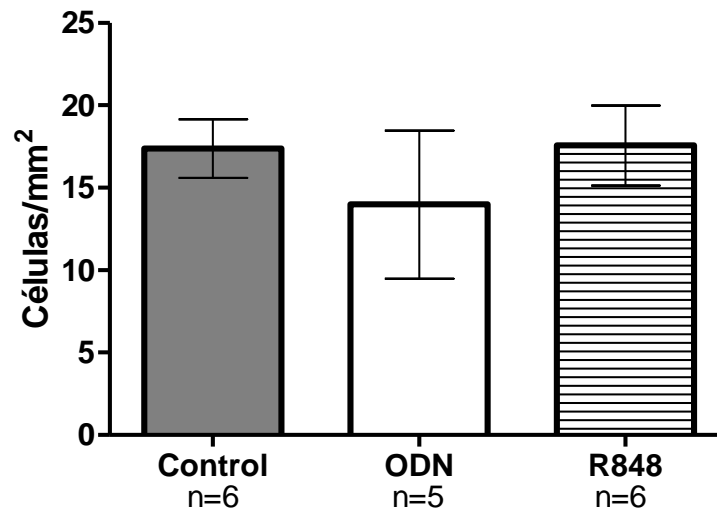
**Figura 10. Efecto de CpG ODN y R848 sobre la expresión del marcador de proliferación PCNA en xenotrasplantes murinos de meduloblastoma.** (A) Imagen representativa de la expresión de PCNA por western blot de dos geles. (B) Cuantificación de la expresión de PCNA en los diferentes tratamientos. Las barras representan el promedio de la expresión relativa de PCNA con respecto a  $\beta$ -actina en los tumores  $\pm$  SEM. U.A – unidades arbitrarias.

El Ki67 es una proteína utilizada como medio predictivo de la eficacia de un tratamiento oncológico o pronóstico en pacientes. Se expresa en el núcleo de todas las células excepto las células quiescentes, esto lo hace una gran herramienta para determinar el crecimiento celular y está asociada a la proliferación celular [65].

Medimos la presencia de Ki67 en cortes histológicos de los tumores por inmunohistoquímica (**Fig. 11**). Se realizaron cortes histológicos de diferentes áreas de cada uno de los tumores para posteriormente realizar el conteo de las células positivas para la proteína Ki67 con el programa ImageJ. El conteo indica que hay un menor número de células positivas por área en los tumores tratados con CpG ODN en comparación con los tumores tratados con R848 y los controles, donde hay más células positivas (**Fig. 12**). Estos resultados son congruentes con el efecto sobre el volumen tumoral, pero no son estadísticamente significativos. Por otra parte, en las imágenes se observa la gran heterogeneidad del meduloblastoma, hay áreas de alta expresión de Ki67 y áreas de baja o nula expresión, independientemente del tratamiento.



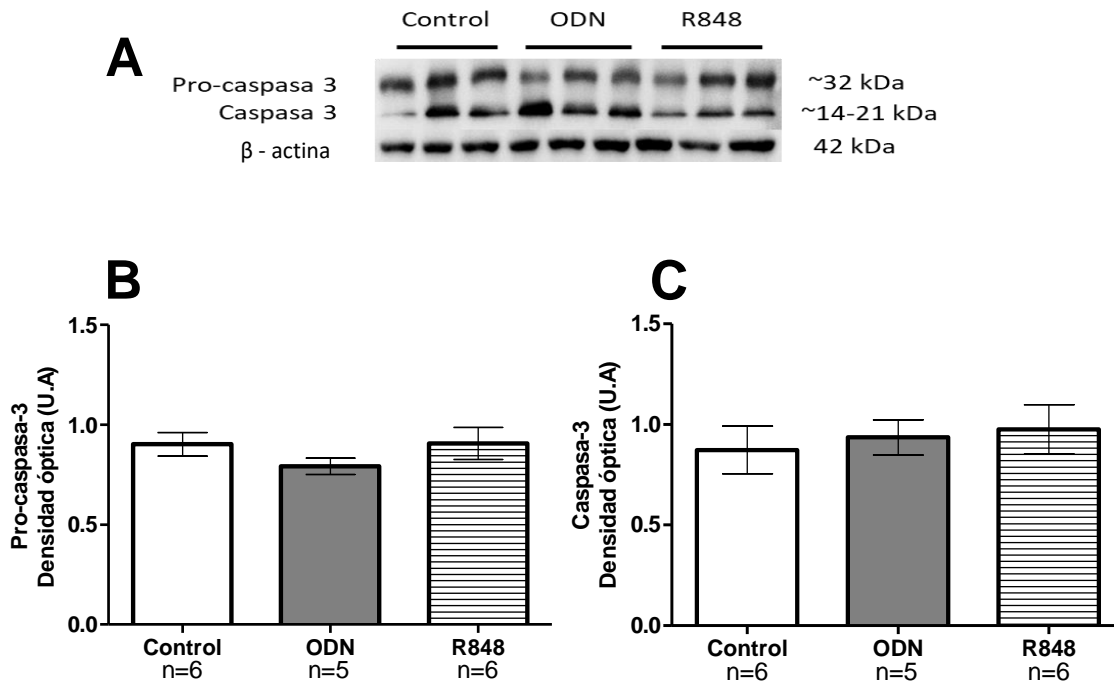
**Figura 11. Efecto del CpG ODN y R848 sobre la expresión de Ki67 en xenotrasplantes murinos de meduloblastoma.** Imágenes representativas de diferentes tumores teñidos para Ki67 por inmunohistoquímica (20x). Las células positivas a Ki67 (cafés) fueron teñidas utilizando DAB como sustrato y se realizó una contratinción con hematoxilina. Cada una de las imágenes corresponde a un tumor diferente. (A) Cortes histológicos de tumores sin tratamiento; (B) tratados con CpG ODN y (C) tratados con R848.



**Figura 12. Cuantificación de células positivas para Ki67 en cortes histológicos de xenotrasplantes murinos de meduloblastoma. Las barras representan el promedio de células positivas por área  $\pm$  SEM.**

### viii. e. Efecto de la estimulación con CpG ODN y R848 sobre la activación de caspasa-3 en xenotrasplantes murinos de meduloblastoma

Para conocer si el CpG ODN y el R848 tienen la capacidad de inducir apoptosis de las células tumorales, realizamos ensayos western blot para medir la expresión de caspasa-3 en su forma activa e inactiva (pro-caspasa-3) (**Fig. 13A**). Los resultados mostraron que no había diferencias significativas en la expresión de pro-caspasa-3 (**Fig. 13B**) y caspasa-3 (**Fig. 13C**) en nuestras diferentes condiciones experimentales. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que los tratamientos no inducen apoptosis dependiente de caspasas.



**Figura 13. Expresión de pro-caspasa-3 y caspasa-3 en tumores en xenotrasplantes murinos de meduloblastoma.** (A) Imagen representativa de la expresión de proteínas por western blot de dos geles. (B) y (C) Cuantificación de la expresión de pro-caspasa-3 y caspasa-3. Las barras representan el promedio de la expresión relativa de las proteínas con respecto a  $\beta$ -actina  $\pm$  SEM. U.A – unidades arbitrarias.

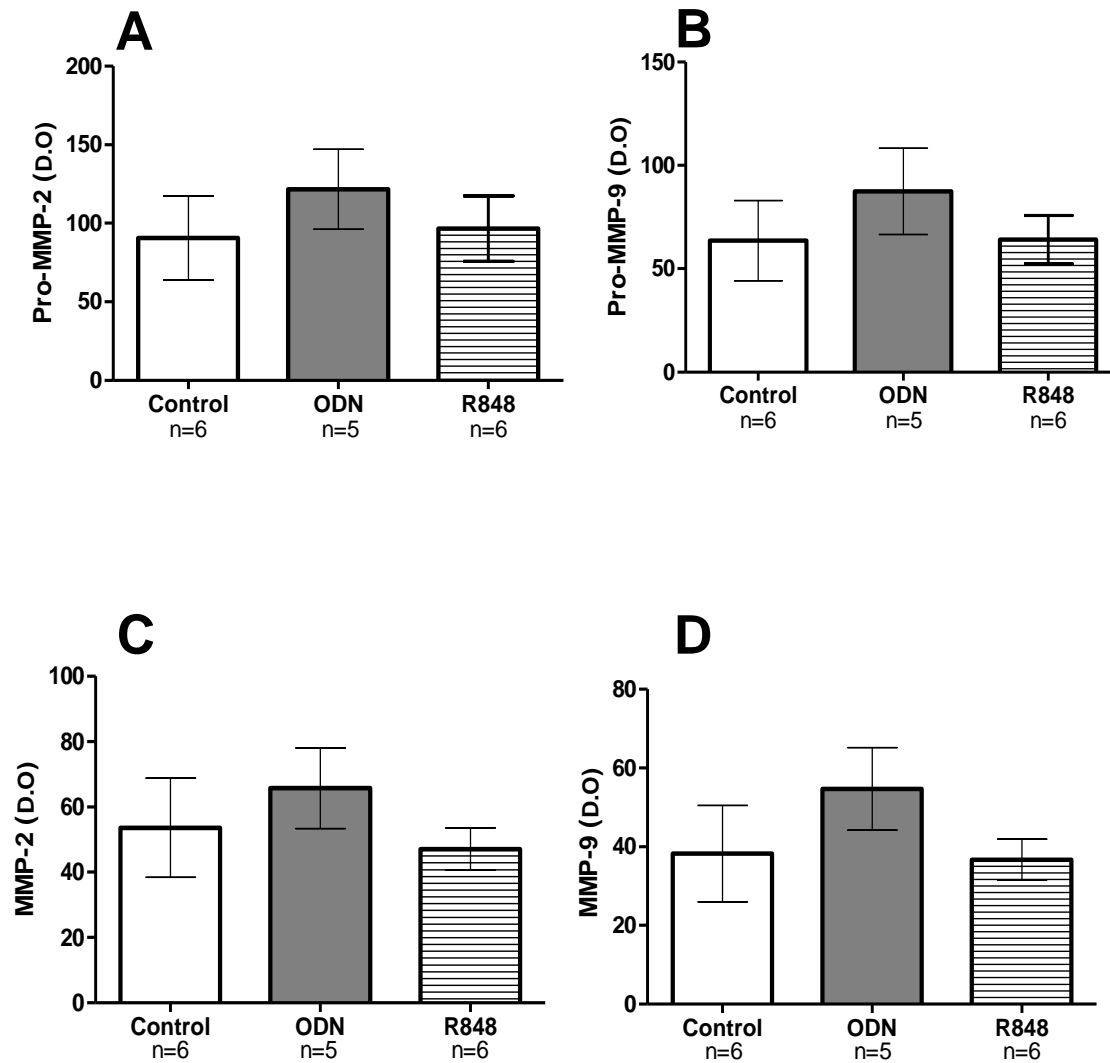
#### **viii. f. Efecto de la estimulación con CpG ODN y R848 sobre la expresión de MMP-2 y MMP-9 activas e inactivas en xenotrasplantes murinos de meduloblastoma**

Una de las características principales del meduloblastoma es su capacidad para migrar e invadir tejidos adyacentes. En consecuencia, evaluamos el efecto de CpG ODN y R848 en algunas de las proteínas asociadas a la formación de metástasis.

Para establecer el efecto de la activación de TLRs sobre la expresión y actividad de MMP-2 y MMP-9, las principales enzimas asociadas a invasión y migración tumoral, se realizó un zimograma. El zimograma es una técnica que permite identificar metaloproteasas por medio de peso y carga, como también por su actividad proteolítica, mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida y gelatina porcina (substrato de la MMP-2 y MMP-9) **(Anexo II)**.

Los tumores inyectados con CpG ODN tienden a expresar más pro-MMP-2 y pro-MMP-9 **(Fig. 14A, 14B)**. A su vez, MMP-2 y MMP-9 se encuentran en mayor cantidad **(Fig.14C, 14D)**, a comparación de aquellos tratados con R848 en los cuales se observa una tendencia similar a los tumores control. No obstante, los resultados no son estadísticamente significativos.





**Figura 14. Evaluación de la expresión de MMP-2 y MMP-9 activas e inactivas en xenotrasplantes murinos de meduloblastoma.** Las barras representan la densidad óptica promedio (D.O)  $\pm$  SEM de la pro-MMP-2 (A), pro-MMP-9 (B), MMP-2 (C) y MMP-9 (D).

## IX. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, estudiamos el efecto de la estimulación del TLR7/TLR8 y TLR9 con R848 y CpG ODN respectivamente, sobre la proliferación, volumen tumoral, apoptosis y expresión de MMPs en un modelo murino de meduloblastoma.

Primero, medimos la expresión de los TLR7, TLR8 y TLR9 en los xenotrasplantes murinos. Nuestros resultados mostraron una tendencia en los tumores tratados con CpG ODN a expresar menos TLR9 en comparación con los controles y los tratados con R848. Esta tendencia puede ser explicada por medio de uno de los mecanismos de reconocimiento de ligandos y activación de TLR9. Ewald et al. (2008) y Park et al. (2008) proponen que TLR9 se activa cuando el dominio LRR es escindido y degradado en el endolisosoma por enzimas proteolíticas después de reconocer a su ligando [66, 67]. Dicha escisión podría ser responsable de la menor expresión de TLR9 en los tumores tratados con CpG ODN. Mientras tanto, la expresión de TLR7 no muestra diferencias significativas o tendencias entre los tratamientos y el grupo control [66, 67]. Con relación al TLR8, no podemos descartar su presencia en los xenotrasplantes. Diferentes autores han descrito la presencia de TLR8 en glioma y células del SNC, como neuronas y microglia [44]. Por lo tanto, la no expresión de TLR8 puede ser consecuencia de una expresión limitada en los tumores o de alguna de nuestras condiciones experimentales como el anticuerpo primario, pero es necesario realizar experimentos complementarios que permitan comprobar ambas hipótesis. Cabe subrayar que no hay estudios preliminares publicados que confirmen la presencia de TLR7, TLR8 y TLR9 en xenotrasplantes murinos de meduloblastoma, por lo que nuestros resultados representan un paso importante en la investigación y desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

Estudios previos han demostrado que la relevancia de la expresión de TLRs en las células tumorales, es un marcador pronóstico de la enfermedad de acuerdo al tejido donde se encuentren. En cáncer de pulmón, la expresión de TLR7 está asociada a un mal pronóstico clínico, pero en melanoma, la expresión de TLR7 y

TLR8 es sinónimo de una mayor supervivencia [68]. Por otro lado, se ha descrito que la expresión del TLR9 en cáncer de esófago correlaciona con la etapa de la enfermedad y alta proliferación de células malignas. Con respecto a tumores del SNC, la expresión de TLR9 en glioma aumenta con respecto al grado de la enfermedad y por tanto, se relaciona con una peor supervivencia [68].

Posteriormente, al evaluar el efecto de la administración intratumoral de CpG ODN y R848 sobre el volumen tumoral en un modelo murino, encontramos una disminución estadísticamente significativa del volumen tumoral en los ratones tratados con CpG ODN y con un volumen tumoral menor que  $200 \text{ mm}^3$  antes del tratamiento, esto significa que el tratamiento funciona para tumores pequeños. Esto coincide con los resultados de Antoine et al. (2000) donde ratas con glioblastoma tratadas con una inyección intratumoral de CpG ODN presentaron disminución del volumen tumoral [62]. Por otra parte, Zhao et al. (2014) observó que los tumores con volumen inicial mayor de  $200 \text{ mm}^3$  de un modelo murino de cáncer de colon, aumentaron de tamaño después de la estimulación con CpG ODN y con 3M-052 (agonista de TLR7/8) [69]. Estos resultados sugieren que el efecto del tratamiento depende en parte del volumen tumoral al iniciar el tratamiento.

Stathopoulos et al. (2012) describió la disminución del volumen tumoral en ratas con glioma administradas por vía parenteral con R848 [59]. Sin embargo, en nuestros resultados observamos una tendencia del volumen tumoral a aumentar, pero no son significativos y sólo podemos inferir que no afecta el desarrollo tumoral.

Posteriormente decidimos evaluar algunos mecanismos por los cuales la activación de los TLRs podría influir sobre el desarrollo del tumor, como la angiogénesis, la proliferación y la muerte celular. La angiogénesis es el proceso por el cual nuevos vasos sanguíneos emergen de vasos sanguíneos pre-existentes [26, 70]. Este proceso es necesario para la difusión de nutrientes, oxígeno, proliferación y crecimiento de las células tumorales [26, 70].

La MMP-3 está relacionada con la angiogénesis durante la progresión tumoral y se encuentra en estudio como marcador pronóstico de cáncer [26, 70]. Mehner et al. (2015) demostraron que la expresión de MMP-3 pronostica una menor supervivencia en pacientes con cáncer de páncreas [70]. Sorprendentemente, encontramos una disminución significativa de la expresión de MMP-3 en los tumores tratados con CpG ODN y R848 a comparación con los tumores control, lo cual podría resultar favorable para el tratamiento del meduloblastoma. Los resultados indican que ambos agonistas podrían disminuir la angiogénesis y mejorar el pronóstico de la enfermedad.

Después, investigamos si la disminución del volumen tumoral se debía a la inhibición de la proliferación. Para ello, medimos la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). El PCNA es una proteína expresada en el núcleo celular cuando la célula está proliferando y ayuda a la reparación de DNA. La nula expresión de PCNA en células quiescentes, la hace un buen marcador de proliferación. En 1997 Liang et al. demostró que a menor expresión de PCNA mejor es el pronóstico y supervivencia de pacientes con meduloblastoma y que PCNA puede ser utilizado como marcador de proliferación en meduloblastoma [71]. Nuestras gráficas sugieren mayor expresión de PCNA en aquellos tratados con R848 y CpG ODN. Y aunque existe concordancia entre la tendencia a la alta de la expresión de PCNA y el aumento del volumen tumoral en los ratones tratados con R848, no parece haber relación entre el PCNA y la disminución del volumen aquellos tratados con CpG ODN ni en la expresión de PCNA y el aumento del volumen tumoral de los tumores control. Por lo que posteriormente, empleamos un segundo marcador. La proteína Ki67 se encuentra en todos los núcleos celulares, excepto en las células en etapa G0. No obstante, su función en el ciclo celular no es clara. Los cambios en la expresión de Ki67 en células tumorales en comparación a células normales, puede utilizarse como un medio predictivo de la eficacia de un tratamiento o pronóstico en pacientes con cáncer [65]. Zhao et al. (2018) concluyó que el Ki67 puede ser considerado como un valioso marcador de pronóstico en pacientes adultos con meduloblastoma al cuantificarlo y comparar su expresión en muestras de pacientes con diferentes

subtipos histológicos [72]. Asimismo, en nuestros resultados, el conteo de células positivas para Ki67 coincide con los resultados observados en la medición del volumen tumoral. Los tumores administrados con R848 muestran una tendencia a presentar mayor número de células positivas que los tratados con CpG ODN. Al mismo tiempo, los tumores control y los inyectados con R848, muestran tendencias similares.

Los resultados muestran que la expresión de PCNA y Ki67 no coinciden y la correlación entre estos marcadores de proliferación celular es controversial [65]. Chaloob et al. (2012) encontró una correlación positiva significativa entre Ki67 y PCNA en astrocitomas de pacientes [73]. Por otro lado, Juríková et al. (2016) describió que había una baja correlación entre ambos marcadores en cáncer de seno [65]. Esto se refiere a que la expresión de Ki67 y PCNA no coincide en áreas de alta proliferación del mismo tumor [65, 74]. Ambos estudios sugieren que los marcadores de proliferación pueden variar entre ellos de acuerdo al tipo de cáncer. Las diferencias entre PCNA y Ki67 en nuestros resultados podrían ser consecuencia de la alta heterogenicidad del meduloblastoma y de las características de los marcadores como las diferencias de expresión y sus funciones en la célula [65].

Ha sido documentado que la estimulación de TLRs lleva a cabo su efecto directamente sobre las células tumorales, como por ejemplo, inducir apoptosis [44]. Andaloussi et al. (2006) demostró que la estimulación con CpG ODN promueve la apoptosis dependiente de caspasa-3 de células de glioma y aumenta la supervivencia de ratones implantados con glioma (GL261) y Kumar (2015) describió que el uso de imiquimod, un agonista de TLR7, también induce apoptosis de las células tumorales en cáncer cutáneo [49, 55]. Nosotros no observamos diferencias significativas en la cantidad de pro-caspasa-3 y caspasa-3. Lo cual sugiere que los tratamientos no inducen un mecanismo de muerte celular dependiente de caspasa-3. Sin embargo, esto no descarta la posibilidad de que los agonistas tengan un efecto sobre la muerte celular tumoral. Actualmente

se conocen diferentes mecanismos de muerte celular que son independientes de caspasas como necrosis o metuosis, que aún no pueden ser descartados [76].

Las metaloproteasas de matriz extracelular son un componente esencial del microambiente tumoral, y su expresión y activación está modificada en casi todos los tipos de cáncer. Entre ellas, la MMP-2 y la MMP-9 son de las más estudiadas al estar asociadas con la invasión de tejidos adyacentes por parte de las células tumorales. Previamente, Cueva et al. (2011) encontró expresión de MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 y MMP-14 en muestras de pacientes con meduloblastoma, pero no describió si estas podían ser reguladas por agonistas de los TLRs [77]. Por otra parte, también observamos una tendencia de los tumores tratados con CpG ODN a mostrar mayor expresión de MMP-2, MMP-9, pro-MMP-2 y pro-MMP-9. Los resultados sugieren que la estimulación del TLR9 con CpG ODN podría tener un efecto pro-tumoral al aumentar la expresión y actividad proteolítica en el meduloblastoma. Sin embargo los resultados no son significativos y los agonistas de TLRs no están considerados como agentes de terapia única. Este resultado es de gran importancia para entender los mecanismos por los cuales las MMPs pueden ser reguladas.

En resumen, evidenciamos que los tumores provenientes de un xenotrasnplante murino de meduloblastoma expresan TLR7 y TLR9 y que los tumores tratados con CpG ODN tienen una tendencia a expresar menor cantidad de TLR9. Y la activación de TLR9 con CpG ODN disminuye el volumen tumoral en un modelo murino de meduloblastoma y que la activación de TLR7/TLR8 con R848 parece no tener un efecto importante sobre el volumen tumoral. También, la estimulación de TLR9 con CpG ODN parece tener un efecto sobre la proliferación celular tumoral (menor expresión de Ki67). PCNA y Ki67 no expresan tendencias similares comparables bajo nuestras condiciones experimentales.

La estimulación con CpG ODN y R848 no tienen efecto sobre la expresión de caspasa-3 activa e inactiva, esto indica que no inducen apoptosis de las células tumorales. Aunque, los resultados no descartan la posibilidad de que estos agonistas induzcan muerte celular tumoral a través de otro mecanismo.

La expresión de MMP-2 y MMP-9 activa e inactiva se observa aumentada en los tumores tratados con CpG ODN de forma no significativa.

Finalmente, demostramos que la expresión de MMP-3, marcador pronóstico y de angiogénesis, se ve significativamente disminuida en los tumores tratados con R848 y CpG ODN en comparación de los tumores control, indicando que la estimulación de TLR7/TLR8 y TLR9 posiblemente podrían disminuir la angiogénesis y mejorar el pronóstico de la enfermedad.

Es necesario realizar más estudios que permitan explorar a profundidad nuestros hallazgos.

## X. CONCLUSIONES

- Los xenotrasplantes murinos de meduloblastoma expresan TLR7 y TLR9 pero no TLR8 en nuestras condiciones experimentales.
- El tratamiento con CpG ODN disminuye significativamente el volumen tumoral en tumores cuyo volumen inicial es menor de 200 mm<sup>3</sup>. El tratamiento con R848 no afecta el desarrollo tumoral.
- El CpG ODN muestra una tendencia a disminuir la expresión del marcador de proliferación Ki67 en los tumores.
- La estimulación intratumoral con CpG ODN y R848 disminuye la expresión de la MMP-3 en los xenotrasplantes.
- La activación de TLR7/TLR8 y TLR9 con CpG ODN y R848 no tiene un efecto significativo sobre la expresión de pro-caspasa-3 y caspasa-3.
- Existe una tendencia de los tumores tratados con CpG ODN a mostrar mayor expresión de MMP-2 y MMP-9, así como de las formas inactivas.



## **XI. PERSPECTIVAS**

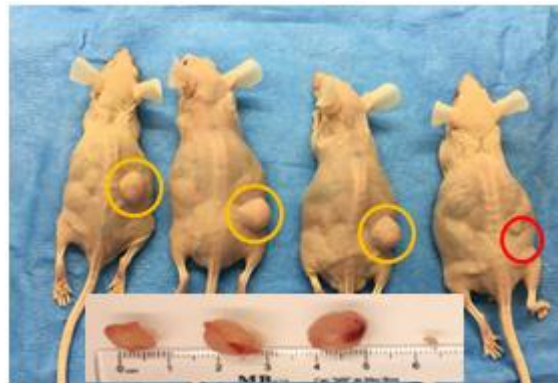
- Aumentar la n para disminuir la variabilidad biológica o implantar dos tumores a cada ratón, de tal forma que cada ratón sea su propio control para disminuir la variabilidad.
- Evaluar la respuesta de ratones con quimioterapia en concomitancia con ligandos sintéticos de los TLRs.
- Repetir los experimentos y hacer gráficas de supervivencia por tratamiento, para conocer si estos ligandos tienen un efecto sobre la supervivencia de los ratones.
- Repetir los ensayos de proliferación celular con otras técnicas como fluorescencia o citometría de flujo.
- Evaluar otros mecanismos de muerte celular que CpG ODN y R848 podrían estar activando.
- Realizar los experimentos en ratones con un sistema inmunológico normal.

## XII. ANEXO I

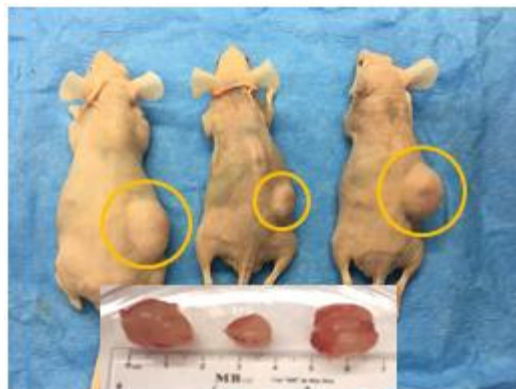
A



B

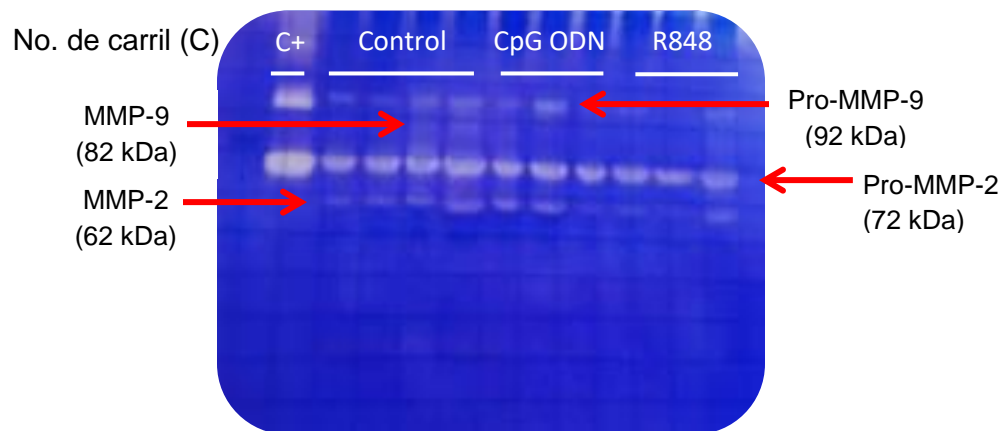


C



**Anexo I. Extracción de xenotrasplantes murinos de meduloblastoma. Imágenes representativas. (A) Ratones control (B) Ratones tratados con CpG ODN (C) Ratones tratados con R848.**

### XIII. ANEXO II



**Anexo II. Imagen representativa de un zimograma.** Las bandas blancas representan la degradación del colágeno por acción de las enzimas. Las muestras están en el siguiente orden: medio de células U937 (control positivo, C+), tumores control, tumores tratados con CpG ODN y tumores tratados con R848.

### XIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud (2018) *Cáncer*. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
2. Secretaría de Salud (2017) 318. *Cáncer, tercera causa de muerte en México* Recuperado de: <https://www.gob.mx/salud/prensa/318-cancer-tercera-causa-de-muerte-en-mexico>
3. Organización Mundial de la Salud (2019) *Estimated number of new cases in 2018, worldwide, all cancers, both sexes, ages 0-19. GLOBOCAN 2019* Recuperado de: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=3&nb\\_items=7&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=1&include\\_nmsc\\_other=1&half\\_pie=0&donut=0&population\\_group\\_globocan\\_id=](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=3&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0&population_group_globocan_id=)
4. Pouchieu, C., Gruber, A., Berteaud, E., Ménégon, P., Monteil, P., Huchet, A. et al. (2018). *Increasing incidence of central nervous system (CNS) tumors (2000–2012): findings from a population based registry in Gironde (France)*. *BMC Cancer*, 18(1).
5. Ramis, R., Tamayo-Uria, I., Gómez-Barroso, D., López-Abente, G., Morales-Piga, A., Pardo Romaguera, et al. (2017). *Risk factors for central nervous system tumors in children: New findings from a case-control study*. *PLOS ONE*, 12(2), e0171881.
6. American Society of Clinical Oncology (2019) *Tumores pediátricos del sistema nervioso central: Introducción*. Recuperado de: <https://www.cancer.net/es/tipos-de-cancer/tumor-del-sistema-nervioso-central-cancer-infantil/introducci%C3%B3n>
7. Igual, L., Berlanga, P. & Cañete A. (2017). *Meduloblastoma: mejoría de la supervivencia en las últimas décadas. Experiencia de un centro*. *Anales de Pediatría*, 86(1), 4–10.

8. Gajjar, A. J., & Robinson, G. W. (2014). *Medulloblastoma—translating discoveries from the bench to the bedside. Nature Reviews Clinical Oncology, 11(12), 714–722.*
9. Morrissy, A. S., Cavalli, F. M. G., Remke, M., Ramaswamy, V., Shih, D. J. H., Holgado, B. L. et al. (2017). *Spatial heterogeneity in medulloblastoma. Nature Genetics, 49(5), 780–788.*
10. Mahapatra S, Amsbaugh M. (2019) *Cancer, Medulloblastoma. StatPearls.* Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK431069/>
11. Bautista, F., Fioravanti, V., de Rojas, T., Carceller, F., Madero, L., Lassaletta, A., & Moreno, L. (2017). *Medulloblastoma in children and adolescents: a systematic review of contemporary phase I and II clinical trials and biology update. Cancer Medicine, 6(11), 2606–2624.*
12. Gajjar, A. J., & Robinson, G. W. (2014). *Medulloblastoma—translating discoveries from the bench to the bedside. Nature Reviews Clinical Oncology, 11(12), 714–722.*
13. Packer, R. J. et al. (1999) *Treatment of children with medulloblastomas with reduced-dose craniospinal radiation therapy and adjuvant chemotherapy: a Children’s Cancer Group Study. J. Clin. Oncol. 17, 2127–2136*
14. Mulhern, R. K., Merchant, T. E., Gajjar, A. Reddick, W. E. & Kun, L. E. (2004) *Late neurocognitive sequelae in survivors of brain tumours in childhood. LancetOncol. 5, 399–408.*
15. Wang, M., Zhao, J., Zhang, L., Wei, F., Lian, Y., Wu, Y. et al. (2017). *Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. Journal of Cancer, 8(5), 761–773.*
16. Zheng, J. & Gao, P. (2019). *Toward Normalization of the Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. Integrative Cancer Therapies, 18, 153473541986235.*
17. Kalluri, R., & Zeisberg, M. (2006). *Fibroblasts in cancer. Nature Reviews Cancer, 6(5), 392–401.*
18. Fouad, Y. & Aanei, C. (2017) *Review Article Revisiting the hallmarks of cancer American Journal of Cancer Research, 7(5): 1016–1036.*

19. Gatenby, R. & Gillies, R. (2004). *Why do cancers have high aerobic glycolysis?* *Nature Reviews Cancer*, 4(11), 891–899.
20. Greten, F. & Grivennikov, S. (2019). *Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences.* *Immunity*, 51(1), 27–41
21. Roma-Rodrigues, C., Mendes, R., Baptista, P. & Fernandes, A. (2019) *Targeting tumor microenvironment for cancer therapy.* *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 4, p. 840.
22. Cen, X., Liu, S. & Cheng, K. (2018). *The Role of Toll-Like Receptor in Inflammation and Tumor Immunity.* *Frontiers in Pharmacology*, 9.
23. Roma-Rodrigues, C., Mendes, R., Baptista, P., & Fernandes, A. (2019). *Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy.* *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 840.
24. Xie, Y., Mustafa, A., Yerzhan, A., Merzhakupova, D., Yerlan, P., N Orakov, A. et al. (2017). *Nuclear matrix metalloproteinases: functions resemble the evolution from the intracellular to the extracellular compartment.* *Cell Death Discovery*, 3, 17036.
25. Djuric, T., & Zivkovic, M. (2017). *Overview of MMP Biology and Gene Associations in Human Diseases. The Role of Matrix Metalloproteinase in Human Body Pathologies.* Recuperado de: <https://www.intechopen.com/books/the-role-of-matrix-metalloproteinase-in-human-body-pathologies/overview-of-mmp-biology-and-gene-associations-in-human-diseases>
26. Quintero-Fabián, S., Arreola, R., Becerril-Villanueva, E., Torres-Romero, J. C., Arana-Argáez, V., Lara-Riegos, J. et al. (2019). *Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer.* *Frontiers in Oncology*, 9.
27. Parkin, J., & Cohen, B. (2001). *An overview of the immune system.* *The Lancet*, 357(9270), 1777–1789.
28. Warrington, R., Watson, W., Kim, H. L., & Antonetti, F. (2011). *An introduction to immunology and immunopathology.* *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 7(Suppl 1), S1.

29. Smith, M., García-Martínez, E., Pitter, M. R., Fucikova, J., Spisek, R., Zitvogel, L. et al. (2018). *Trial Watch: Toll-like receptor agonists in cancer immunotherapy*. *Onc Immunology*, 1–15.
30. Kindt, T. J., Goldsby, R. A., Osborne, B. A., & Kuby, J. (2014). *Inmunología de Kuby*. Macmillan. págs. 635-639.
31. Portou, M. J., Baker, D., Abraham, D., & Tsui, J. (2015). *The innate immune system, toll-like receptors and dermal wound healing: A review*. *Vascular Pharmacology*, 71, 31–36.
32. Braunstein, M. J., Kucharczyk, J., & Adams, S. (2018). *Targeting Toll-Like Receptors for Cancer Therapy*. *Targeted Oncology*.
33. López-Yglesias, A., Camanzo, E., Martin, A., Araujo, A., & Yarovinsky, F. (2019). *TLR11-independent inflammasome activation is critical for CD4+ T cell-derived IFN- $\gamma$  production and host resistance to Toxoplasma gondii*. *PLOS Pathogens*, 15(6), e1007872.
34. Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). *Pattern Recognition Receptors and Inflammation*. *Cell*, 140(6), 805–820.
35. Hanke, M. L., & Kielian, T. (2011). *Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential*. *Clinical Science*, 121(9), 367–387.
36. Pandya, P. H., Murray, M. E., Pollok, K. E., & Renbarger, J. L. (2016). *The Immune System in Cancer Pathogenesis: Potential Therapeutic Approaches*. *Journal of Immunology Research*, 2016, 1–13.
37. Vidya, M. K., Kumar, V. G., Sejian, V., Bagath, M., Krishnan, G., & Bhatta, R. (2017). *Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals*. *International Reviews of Immunology*, 37(1), 20–36.
38. Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). *Toll-Like Receptor Signaling Pathways*. *Frontiers in Immunology*, 5.
39. Refat, E-Z., Sibaii, H., & Mannaa, F. (2019). *Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview*. *Bulletin of the National Research Centre*, 43:187.

40. De León, J., & Pareja, A. (2018). *Inmunología del cáncer I: bases moleculares y celulares de la respuesta inmune antitumoral*. *Horizonte Médico*, 18(3), 80–89.
41. O'Donnell, J., Teng, M., & Smyth, M. (2018). *Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy*. *Nature Reviews Clinical Oncology*.doi:10.1038/s41571-018-0142-8
42. Dajon, M., Iribarren, K. and Cremer, I. (2017) *Toll-like receptor stimulation in cancer: a pro- and anti-tumor double-edged sword*. *Immunobiology*, vol. 222, no. 1, pp. 89–100.
43. Yang, H., Zhou, H., Feng, P., Zhou, X., Wen, H., Xie, X. et al. (2010). *Reduced expression of Toll-like receptor 4 inhibits human breast cancer cells proliferation and inflammatory cytokines secretion*. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 29(1), 92.
44. Abarca-Merlin, D. M., Maldonado-Bernal, C., & Alvarez-Arellano, L. (2019). *Toll-Like Receptors as Therapeutic Targets in Central Nervous System Tumors*. *BioMed Research International*, 2019, 1–9.
45. Chicoine, M., Zahner, M., Won, E. K. et al. *The in vivo antitumoral effects of lipopolysaccharide against glioblastoma multiforme are mediated in part by toll-like receptor 4*, *Neurosurgery*, vol. 60, no. 2, pp. 372–381, 2007.
46. Nagata, S. (2018). *Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells*. *Annual Review of Immunology*, 36(1), 489–517.
47. Pfeffer, C. & Singh A. (2018). *Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 448.
48. Behzadi, P., & Ranjbar, R. (2015). *Caspases and Apoptosis*. *Molecular Enzymology and Drug Targets*, 01(02).
49. Kumar, R., Herbert, P. & Warrens, A. (2005). *An introduction to death receptors in apoptosis*. *International Journal of Surgery*, 3(4), 268–277.
50. Lossi, L., Castagna, C., & Merighi, A. (2018). *Caspase-3 Mediated Cell Death in the Normal Development of the Mammalian Cerebellum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 3999.



51. Shi, M., Chen, X., Ye, K., Yao, Y., & Li, Y. (2016). *Application potential of toll-like receptors in cancer immunotherapy. Medicine, 95(25), e3951.*
52. Ganapathi, L., Van Haren, S., Dowling, D., Bergelson, I., Shukla, N., Malladi, S. et al. (2015). *The Imidazoquinoline Toll-Like Receptor-7/8 Agonist Hybrid-2 Potently Induces Cytokine Production by Human Newborn and Adult Leukocytes. PLOS ONE, 10(8), e0134640.*
53. Dolin, R. (2015) *Miscellaneous Antiviral Agents (Interferons, Imiquimod, Pleconaril). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 576-580. e2*
54. Spaner, D., Shi, Y., White, D., Mena, J., Hammond, C., Tomic, J., He, L., Tomai, M.A., et al. (2006) *Immunomodulatory effects of Toll-like receptor-7 activation on chronic lymphocytic leukemia cells. Leukemia 20, 286–295.*
55. El Andaloussi, A., Sonabend, A., Han, Y. and Lesniak, M. (2006) *Stimulation of TLR9 with CpG ODN enhances apoptosis of glioma and prolongs the survival of mice with experimental brain tumors. Glia, vol.54 (6), 526–535.*
56. Krieg, A. (2007) *Development of TLR9 agonists for cancer therapy. The Journal of Clinical Investigation, vol.117, no.5, pp.1184– 1194.*
57. Bremer, P., Schlosburg, J., Lively, J. & Janda, K. *Injection Route and TLR9 Agonist Addition Significantly Impact Heroin Vaccine Efficacy. Molecular Pharmaceutics [Artículo] 11, 1075-1080, 2014.*
58. Maslinska, D., Laure-Kamionowska, M. and Maslinski, S. (2012) *Toll like receptors as an innate immunity bridge to neuroinflammation in meduloblastoma. Folia Neuropathologica, vol. 50, no. 4, pp. 375–381.*
59. Stathopoulos, A., Pretto, C., Devillers, L., Pierre, D., Hofman, F. M., Kruse, C. et al. (2012). *Development of immune memory to glial brain tumors after tumor regression induced by immunotherapeutic Toll-like receptor 7/8 activation. Oncolmunology, 1(3), 298–305.*
60. Wang, F., Jin, R., Zou, B.-B., Li, L., Cheng, F.-W., Luo, X., et al. (2015). *Activation of Toll-like receptor 7 regulates the expression of IFN- $\lambda$ 1, p53, PTEN, VEGF, TIMP-1 and MMP-9 in pancreatic cancer cells. Molecular Medicine Reports, 13(2), 1807–1812.*

61. Ruan, M., Zhang, Z., Li, S., Yan, M., Liu, S., Yang, W., et al. (2014). *Activation of Toll-Like Receptor-9 Promotes Cellular Migration via Up-Regulating MMP-2 Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma*. *PLoS ONE*, 9(3), e92748.
62. Grauer O., Molling, J., Benninketal, E. (2014) *TLR ligands in the local treatment of established intracerebral murine gliomas*. *The Journal of Immunology*, vol.181, no.10,pp.6720–6729.
63. Antoine, F., Carpentier, A., Xie, J., Mokhtari, K. and Delattre, J.-Y (2000) *Successful treatment of intracranial gliomas in rat by oligodeoxynucleotides containing CpG motifs*. *Clinical Cancer Research*, vol. 6,no.6,pp.2469–2473.
64. Wu, A., Oh, S., Gharagozlou, S., VEDI, R. N., Ericson, K., Low, W. C., et al. (2007). *In Vivo Vaccination With Tumor Cell Lysate Plus CpG Oligodeoxynucleotides Eradicates Murine Glioblastoma*. *Journal of Immunotherapy*, 30(8), 789–797.
65. Juríková, M., Danihel, L., Polák, Š., & Varga, I. (2016). *Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer*. *Acta Histochemica*, 118(5), 544–552.
66. Ewald SE, Lee BL, Lau L, Wickliffe KE, Shi GP, Chapman HA, et al. (2008) *The ectodomain of toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor*. *Nature* 456 (7222): 658–62.
67. Park, B., Brinkmann, M., Spooner, E., Lee, C., Kim, YM., Ploegh, HL. (2008) *Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of tolllike receptor 9*. *Nat Immunol* 9(12):1407–14.
68. Urban-Wojciuk, Z., Khan, M. M., Oyler, B. L., Fåhraeus, R., Marek-Trzonkowska, N., Nita-Lazar, A. et al. (2019). *The Role of TLRs in Anti-cancer Immunity and Tumor Rejection*. *Frontiers in Immunology*, 10.
69. Zhao, B., Vasilakos, J. P., Tross, D., Smirnov, D., & Klinman, D. M. (2014). *Combination therapy targeting toll like receptors 7, 8 and 9 eliminates large established tumors*. *Journal for Immuno Therapy of Cancer*, 2(1), 12.
70. Mehner, C., Miller, E., Nassar, A., et al. (2015) *Tumor cell expression of MMP3 as a prognostic factor for poor survival in pancreatic, pulmonary, and mammary carcinoma*. *Genes & Cancer*. Vol. 6 (11-12).

71. Liang, S., Zhang, Q., Gu, Y., Li, H., Tan, Y., & Su, X. (1997). *The proliferative activity of medullo-blastoma and its relationship with prognosis. Chinese Journal of Cancer Research, 9(2), 123–126.*
72. Zhao, F., Zhang, J., Li, P., Zhou, Q., Zhang, S., Zhao, C. et al. (2018). *Prognostic value of Ki-67 index in adult medulloblastoma after accounting for molecular subgroup: a retrospective clinical and molecular analysis. Journal of Neuro-Oncology, 139(2), 333–340.*
73. Chalob, M. K., Ali, H. H., Qasim, B. J., & Mohammed, A. S. (2012). *Immunohistochemical Expression of Ki-67, PCNA and CD34 in Astrocytomas: A Clinicopathological Study. Oman Medical Journal, 27(5), 368–374*
74. Sullivan, R. P., Mortimer, G., & Ó Muircheartaigh, I. (1993). *Cell proliferation in breast tumours: Analysis of histological parameters Ki67 and PCNA expression. Irish Journal of Medical Science, 162(9), 343–347*
75. Bubna A. K. (2015). *Imiquimod - Its role in the treatment of cutaneous malignancies. Indian journal of pharmacology, 47(4), 354–359.*
76. Nirmala, J. G., & Lopus, M. (2019). *Cell death mechanisms in eukaryotes. Cell Biology and Toxicology, 36(2):145-164.*
77. Cueva, E., Nascimiento, F., Queiroz, R., et al. (2011) *Protein Expression of the Matrix Metalloproteinase (MMP-1, -2, -3, -9 and -14) in Ewing Family Tumors and Medulloblastoma of Pediatric Patients. Pediatr Therapeut S1:001.*