



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

**ADMINISTRACIÓN CONJUNTA DE LIGANDOS SINTÉTICOS DE LOS TLRs Y  
VINCRISTINA EN UN MODELO MURINO DE MEDULOBLASTOMA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BIOL. RODRÍGUEZ SANTOS GUADALUPE**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA DE LOURDES ÁLVAREZ ARELLANO**  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ  
**COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DEL CARMEN MALDONADO BERNAL**  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ  
**DRA. ALIESHA ARACELI GONZÁLEZ ARENAS**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. ENERO 2024



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

**ADMINISTRACIÓN CONJUNTA DE LIGANDOS SINTÉTICOS DE LOS TLRs Y  
VINCRISTINA EN UN MODELO MURINO DE MEDULOBLASTOMA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BIOL. RODRÍGUEZ SANTOS GUADALUPE**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA DE LOURDES ÁLVAREZ ARELLANO**  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

**COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DEL CARMEN MALDONADO BERNAL**  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

**DRA. ALIESHA ARACELI GONZÁLEZ ARENAS**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. ENERO 2024

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ENTIDAD (FACULTAD DE MEDICINA)  
OFICIO: CGEP/CPCB/FMED/0872/2023  
ASUNTO: Oficio de Jurado

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **25 de septiembre de 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** de la estudiante **RODRÍGUEZ SANTOS GUADALUPE** con número de cuenta **312121758** con la tesis titulada **“ADMINISTRACIÓN CONJUNTA DE LIGANDOS SINTÉTICOS DE LOS TLRs Y VINCRISTINA EN UN MODELO MURINO DE MEDULOBLASTOMA”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA DE LOURDES ÁLVAREZ ARELLANO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. JOSÉ LUIS REYES HERNÁNDEZ  
Vocal: DR. LUIS ENRIQUE ARIAS ROMERO  
Vocal: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA  
Vocal: DRA. MARTA ELENA CASTRO MANRREZA  
Secretario: DRA. ALIESHA ARACELI GONZÁLEZ ARENAS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 07 de noviembre de 2023

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**

c. c. p. Expediente del alumno

AGNS/RCHT/EARR/rcht



## **Agradecimientos institucionales**

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por brindarme la oportunidad de desarrollarme en el campo de la investigación.

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca para poder dedicarme de tiempo completo a mis estudios de maestría.

Al Hospital Infantil de México Federico Gómez por el apoyo y financiamiento HIM2019-031SSAA1583.

A mi tutora la Dra. María de Lourdes Álvarez Arellano y mi comité tutor: la Dra. María del Carmen Maldonado Bernal y la Dra. Aliesha Araceli González Arenas por su tiempo, asesoría y apoyo en mi proyecto de investigación de la maestría.

## *Agradecimientos*

*A mi mamá por seguir apoyándome en mis sueños, escucharme, darme siempre un consejo y todo tu cariño. A mi hermana porque siempre me acompañas en las desveladas y me impulsas a ser mejor.*

*A Gala por siempre estar en las buenas y en las malas, ofreciéndome un abrazo cálido y apoyarme durante este trayecto, eres mi personita.*

*A mis amigos Isra y Marco por haberme alentado desde el proceso de selección, escucharme y darme ánimos.*

*Agradezco a la Dra. María de Lourdes Álvarez Arellano por su apoyo, paciencia, así como los consejos y críticas constructivas para ayudarme a mejorar como estudiante, y formarme en el ámbito científico.*

*Al laboratorio de Investigación en Neurociencias, al jefe el Dr. Juan Carlos Corona por haberme permitido formar parte de su lab, y a los estudiantes por ayudarme con los experimentos y hacer el trabajo más ameno.*

# Índice

## Abreviaturas

1. Resumen .....	1
Abstract .....	2
2. Introducción .....	3
2.1. Cáncer.....	3
2.2. Meduloblastoma .....	4
2.2.1. Diagnóstico y tratamiento .....	6
2.3. Microambiente tumoral.....	8
2.4. Inmunoterapias para el meduloblastoma .....	10
2.5. Receptores tipo Toll .....	12
2.5.1. Señalización de TLRs.....	14
3. Antecedentes.....	18
4. Planteamiento del problema .....	19
5. Hipótesis .....	19
6. Objetivos.....	20
7. Metodología.....	20
7.1. Cultivo celular.....	20
7.2. Modelo murino .....	21
7.3. Inmunohistoquímica .....	21
7.4. Extracción y cuantificación de proteínas .....	22
7.5. Western-blot.....	23
7.6. Análisis estadístico.....	23
8. Resultados.....	24
9. Discusión .....	31
10. Conclusión .....	38
11. Perspectivas .....	39
12. Referencias Bibliográficas .....	40



## Abreviaturas

COX-2	Ciclooxigenasa 2
DAB	3,3'-diaminobezina tetrahydrochloride
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
DR	Receptores de muerte
EMC	Matriz extracelular
EMEM	Medio Eagle mínimo esencial
FN1	Fibronectina 1
HIMFG	Hospital Infantil de México "Federico Gómez"
IGF1	Factor de crecimiento similar a la insulina
LRR	Repeticiones ricas en leucina
MAMPs	Patrones moleculares asociados a microorganismos
MMPs	Metaloproteasas
MRP	Proteína asociada a resistencia multidrogas
PIGF	Factor de crecimiento placentario
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
SHH	Sonic hedgehog
SNC	Sistema nervioso central
T CART	Células T con receptor antígeno quimérico
TAA	Astrocitos asociados a tumor

TAMs	Macrófagos asociados a tumor
TIMPs	Inhibidores de metaloproteasas
TIR	Similar al del receptor de IL-1
TLRs	Receptores tipo Toll
Tregs	Células T reguladoras
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WHO	Organización mundial de la salud

## 1. Resumen

El meduloblastoma es el tumor maligno del SNC más frecuente en la edad pediátrica, es de origen embrionario por lo que es altamente heterogéneo y se clasifica de acuerdo con sus características genéticas e histológicas. La vincristina es un quimioterapéutico que inhibe el ciclo celular al interferir con la polimerización de los microtúbulos. Los receptores tipo Toll (TLRs) se expresan en células del sistema inmune y se ha demostrado que su activación tiene efectos antitumorales y protumorales en varios tipos de cáncer. Sin embargo, en el caso particular del meduloblastoma se desconoce su efecto. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto conjunto de la vincristina con los ligandos sintéticos de TLR7/TLR8 (R848) o TLR9 (ODN clase B) sobre el desarrollo del meduloblastoma en un modelo murino. Encontramos que la administración conjunta de la vincristina con los ligandos sintéticos de TLR7/8 o TLR9 no presentaron un efecto sinérgico sobre la reducción del tamaño del tumor, además aumentaron la proliferación, disminuyeron la apoptosis y la expresión de VEGFC del tumor en comparación con la administración solamente de vincristina. Por lo que la administración de la vincristina en combinación con los ligandos sintéticos de TLR7/TLR8 o TLR9 podría estar proporcionando quimiorresistencia a las células de meduloblastoma y promoviendo el desarrollo del tumor.

## **Abstract**

Medulloblastoma is the most common malignant tumor of the SNC in children age. It's an embryonal tumor so it's highly heterogeneous and is classified according to its genetics and histological characteristics. Vincristine is a chemotherapeutic that inhibits the cell cycle by interfering with microtubule polymerization. Toll-like receptors (TLRs) are expressed by immune system cells and their activation has been shown to have antitumor and protumor effects in various types of cancer. However, in the case of medulloblastoma, its effect is unknown. Therefore, the objective of the present work was to evaluate the joint effect of vincristine with the synthetic ligands of TLR7/TLR8 (R848) or TLR9 (ODN class B) on the development of medulloblastoma in a murine model. We found that the joint administration of vincristine with the synthetic ligands of TLR7/TLR8 or TLR9 didn't present a synergistic effect on the reduction of tumor size, in addition, they increased proliferation, decreased apoptosis, and the expression of VEGFC of the tumor in comparison that with the administration of only vincristine. Therefore, the administration of vincristine in combination with the synthetic ligands TLR7/TLR8 or TLR9 could provide chemoresistance to medulloblastoma cells and promote tumor development.

## **2. Introducción**

### **2.1. Cáncer**

La Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) define al cáncer como una enfermedad multifactorial, en donde células anormales del cuerpo empiezan a crecer de manera descontrolada, estas células pueden formar bultos de tejido, llamados tumores y pueden propagarse hacia otras partes del cuerpo (metástasis). Es considerada la segunda causa de muerte más frecuente a nivel mundial, después de las enfermedades cardiovasculares [1].

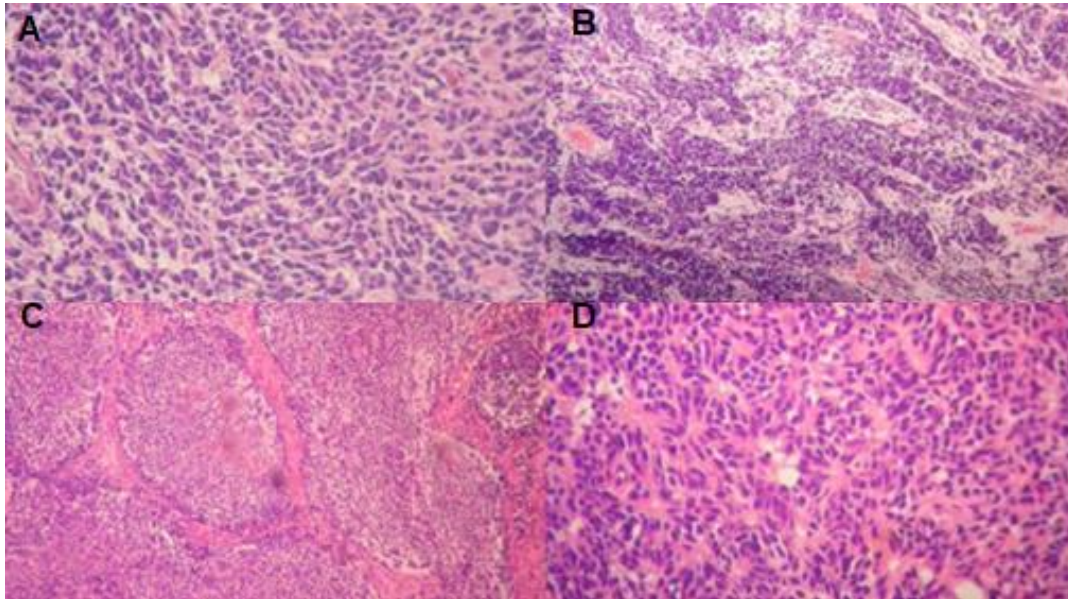
En 2019 se estimaron 23.6 millones de casos de cáncer y 10 millones de muertes. De manera similar, WHO estima cerca de 10 millones de muertes asociadas al cáncer durante el 2020 y aproximadamente cada año 400,000 niños desarrollan cáncer[2,3]. Además, se estima que los casos de muertes por cáncer aumentaron considerablemente debido a la pandemia del SARS-CoV-19, ya que esta causo retrasos en el diagnóstico y tratamiento del cáncer [2,4].

Los tumores del cerebro y del sistema nervioso central (SNC) son los tumores sólidos más frecuentes durante la edad pediátrica en incidencia y mortalidad a nivel mundial y en México, solo superados por las leucemias [5]. Entre los tipos de tumores asociados al SNC más frecuentes se encuentran los ependimomas, los gliomas de bajo y alto riesgo, y los meduloblastomas. Siendo el meduloblastoma el tumor más frecuente durante la edad pediátrica con aproximadamente un 20% del total de los tumores del SNC [6–8].

## 2.2. Meduloblastoma

El meduloblastoma es un tumor de origen embrionario que se desarrolla en el cerebelo, se origina a partir de dos zonas germinales, la matriz ventricular subependimaria y de la capa granular externa, por lo que son altamente heterogéneos [9,10]. La incidencia anual es de ~5 casos por un millón de personas y su pico de mayor incidencia es en niños de 4-7 años [10,11]. La WHO ha clasificado al meduloblastoma de acuerdo con sus características genéticas e histológicas. De acuerdo con el perfil histológico, el meduloblastoma se clasifica en: clásico, desmoplásico/nodular, nodularidad extensa, anaplásico y células grandes. Mientras que por su perfil genético en: WNT, SHH (Sonic Hedgehog) (Tp53 mutante y Tp53 wildtype), grupo 3 y grupo 4 [12–14].

El meduloblastoma clásico es el más frecuente, representa aproximadamente el 72% de los casos de meduloblastoma. Se compone de células pequeñas con escaso citoplasma, grandes núcleos hipercromáticos redondos o angulares, y por lo regular se correlaciona con el subgrupo WNT. El meduloblastoma de tipo desmoplásico/nodular contiene bandas de tejido conectivo intercalados entre las células malignas, nódulos de diferenciación neurocítica y depósitos de reticulina. El tipo extensivo nodular se define por sus grandes nódulos de forma irregular que se pueden unir, escasas regiones desmoplásicas. Por último, el tipo anaplásico y células grandes se asocia con un peor pronóstico, es definido por células redondas grandes uniformes con un solo nucleolo, altas zonas de actividad mitótica y cuerpos apoptóticos (Figura 1) [15,16].



**Figura 1. Clasificación histológica de meduloblastoma.** El meduloblastoma puede clasificarse de acuerdo con sus características histológicas en 4 subtipos. A) clásico. B) Desmoplásico/nodular. C) Extensivo nodular. D) Células grandes y anaplásicas. Imagen modificada de Paday *et al.*, 2019.

Con respecto a su perfil genético el meduloblastoma WNT es el de mejor pronóstico, la tasa de supervivencia libre a 5 años es del 95%, representa aproximadamente el 10% de los casos totales de meduloblastoma, se puede encontrar tanto en niños como en adultos. El 80-90% de los casos de este tipo de meduloblastoma presentan mutaciones en el exón 3 de CTTNB1 (gen que codifica para  $\beta$ -catenina), y esto puede deberse en un 85-90% de los casos en la pérdida total o parcial del cromosoma 6. En pacientes con mutaciones en CTTNB1 es común encontrar el gen APC mutado [11,14,16–18].

El meduloblastoma del subtipo SHH representa aproximadamente el 30% de los casos totales de meduloblastoma, afecta a niños y adultos, tiene una tasa de supervivencia libre del 70%, sin embargo, esto depende del estado molecular que presente el tumor. Cabe mencionar que la vía SHH está encargada de procesos de proliferación celular, progresión del ciclo celular y principalmente promueve la diferenciación celular de precursores granulares celulares. Este subtipo de tumor se

presenta por mutaciones somáticas o germinales o por variaciones en el número de copias en genes de la vía SHH como PTCH1 o SUFU, mutaciones activantes en SMO o amplificaciones en GLI1/2 o el protooncogén MYCN. A menudo este subtipo de meduloblastoma también puede presentar mutaciones en el gen TP53 (un gen encargado de la regulación del ciclo celular, de la reparación al daño de DNA y de la apoptosis), cuando se presenta mutaciones en el gen TP53 la tasa de supervivencia libre se reduce al 40% aproximadamente [11,14,16–19].

A los meduloblastomas que no presentan mutaciones en la vía WNT ni en la SHH, se les ha clasificado en subtipo del grupo 3 y del grupo 4. El subtipo del grupo 3 representa aproximadamente el 25% de los casos totales de meduloblastoma y se ha asociado con el de peor pronóstico, con una tasa de supervivencia global del 50%. Se caracteriza por un nivel elevado de amplificaciones en MYC, GFI1, OTX, y regularmente al momento del diagnóstico se encuentran en etapa de metástasis. Mientras que el grupo 4 cuenta con el 35% de los casos totales de meduloblastoma, y presenta comúnmente sobreexpresión de PRDM6, mutaciones somáticas como en KDM6A, ZMYM3, KTM2C, KBTBD4 y amplificaciones en MYCN, OTX2, CDK6, GFI1 y GFI1B [14,16,20].

### *2.2.1. Diagnóstico y tratamiento*

El meduloblastoma puede presentar diversos síntomas clínicos como fuertes dolores de cabeza, náuseas, vómitos, fatiga, hidrocefalia, ataxia, problemas motores. En pacientes con metástasis pueden presentar dolores de espalda, dificultad al caminar y en ocasiones disfunción intestinal [14,21] .

La estratificación de riesgo del meduloblastoma consiste en tomar en cuenta los distintos factores que presenta el paciente para poder evaluar el riesgo que tiene de morir, así como para poder elegir el mejor tratamiento. Entre los factores tomados en cuenta para la estratificación de riesgo para el meduloblastoma son la edad del paciente, los síntomas clínicos, la extensión del tumor, la etapa en la que se



encuentra el tumor, la extensión de la resección quirúrgica, la histología y el subtipo del tumor. El sistema de estratificación de riesgo se divide en 4 grupos: riesgo bajo (>90% de supervivencia), riesgo estándar (75-90% de supervivencia), alto riesgo (50-70% de supervivencia) y muy alto riesgo (<50% de supervivencia) [20,21].

El tratamiento estándar para el meduloblastoma consiste en un tratamiento multimodal, donde en primer lugar se realiza una resección quirúrgica del tumor, posteriormente si el paciente es mayor de 3-5 años se le administra radioterapia y/o quimioterapia, y en caso de ser menor de 3-5 años, se omite la radioterapia [14,20,21].

En la actualidad existen diversos fármacos utilizados en el tratamiento para el meduloblastoma como lomustina, cisplatino, temozolamida, vincristina, entre otros[14,20–22]. Los primeros tres fármacos son alquilantes del DNA, mientras que la vincristina pertenece a un grupo de fármacos conocidos como alcaloides de la vinca. Este fármaco bloquea el crecimiento celular al interferir con la polimerización de los microtúbulos del huso mitótico, provocando que la mitosis se detenga en la metafase [23].

Si bien todos estos tratamientos incrementan la supervivencia del paciente, los pacientes presentan secuelas que afectan notablemente su calidad de vida, ya que presentan efectos neurológicos y motrices, deficiencias en el crecimiento, en el lenguaje verbal, alteraciones hormonales, entre otros [24,25]. Aunado a lo anterior, se buscan terapias alternativas que mejoren la calidad de vida del paciente y sean eficaces contra el tumor.

### **2.3. Microambiente tumoral**

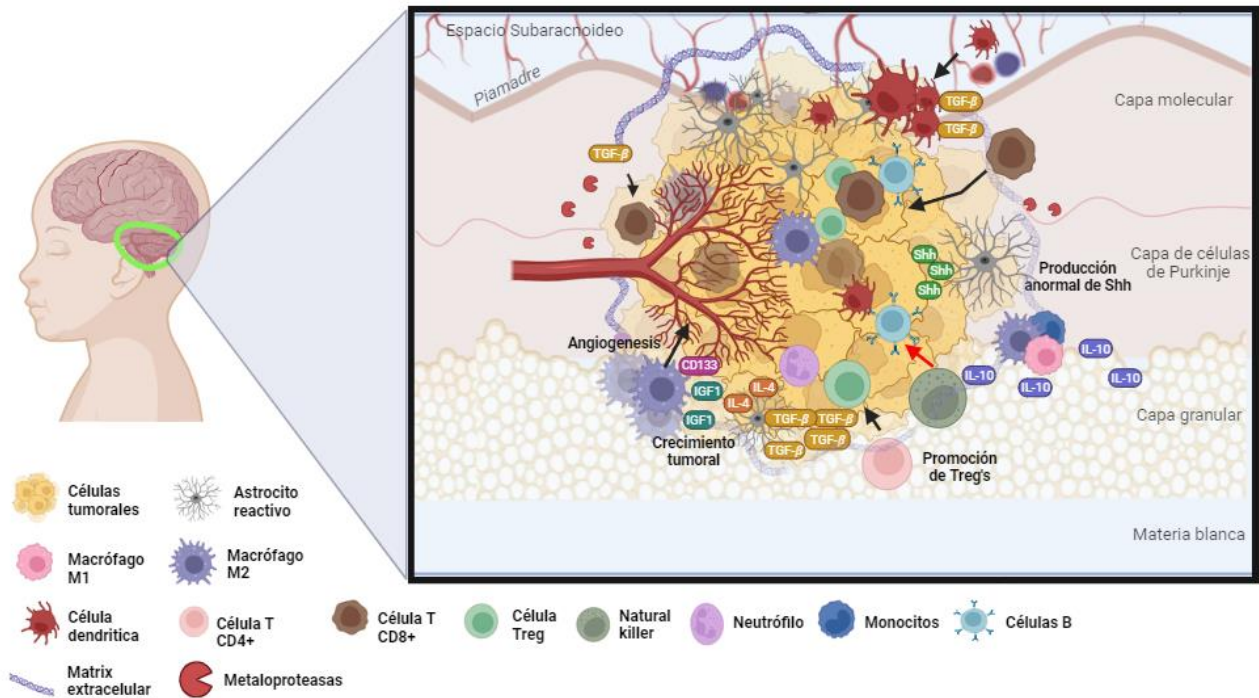
El microambiente tumoral está constituido por infiltrados de células del sistema inmune, vasos sanguíneos y matriz extracelular, los cuales pueden interactuar entre sí y participar en la progresión, metástasis y evasión del sistema inmune (Figura 2) [26,27].

Un factor importante que destacar es que el microambiente del meduloblastoma consta de células residentes del cerebro como la microglía y los astrocitos que juegan un papel importante en la progresión del tumor [27].

Los macrófagos asociados a tumor (TAMs) pueden promover el crecimiento del tumor mediante la inhibición de la actividad de las células T y la promoción de la angiogénesis[28]. En meduloblastomas SHH se ha observado una alta expresión de genes asociados a TAMs M2, macrófagos M1 y M2, infiltración de neutrófilos, células T reguladoras (Tregs), células T PD1<sup>+</sup>. Además, se ha visto que la alta expresión de TGF- $\beta$ , IL-10 y prostaglandina E2 por parte de las células del meduloblastoma puede reducir la proliferación y la activación de células T CD8<sup>+</sup> y células dendríticas, y una reducción de la respuesta antitumoral (Figura 2) [26,28].

Los astrocitos asociados a tumor (TAA) en el meduloblastoma promueven la progresión tumoral a través de la secreción de SHH, y cuando los TAA son deletados el crecimiento tumoral se ve suprimido [29]. Además, los TAA influyen en los fenotipos de las células de meduloblastoma regulando la expresión de CD133, una proteína clave en la supervivencia del tumor. Asimismo, se ha visto que los precursores de neuronas granulares tumorales se pueden transdiferenciar en astrocitos, los que a su vez producen IL-4 y estimula a la microglía para liberar el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1) que contribuye a la progresión del tumor [30,31].

De igual manera se ha observado en biopsias de pacientes un microambiente de perfil no inflamatorio en el meduloblastoma con pocos infiltrados de células inmunes como monocitos, células B, células endoteliales y fibroblastos [32,33].



**Figura 2. Microambiente tumoral del meduloblastoma.** El microambiente se compone de infiltrados de células del sistema inmune, de matriz extracelular y de metaloproteasas, las cuales interactúan entre sí para promover la progresión del tumor. Imagen creada en *biorender*.

La matriz extracelular (EMC) es un factor clave en la progresión del cáncer, ya que cuando su integridad se encuentra comprometida se ha asociado con metástasis del tumor (Figura 2). En este contexto, se sabe que las metaloproteasas (MMPs) son enzimas que al unirse al zinc participan en la degradación de la EMC, incluyendo la membrana basal y la superficie del tumor, lo que promueve la angiogénesis y metástasis [19,34]. En muestras de meduloblastoma clásico y

desmoplásico se ha observado la expresión de MMP9, así como de MMP de tipo membrana como la MT1-MMP y MT2-MMP y muestran una correlación negativa significativa con la supervivencia de los pacientes. Además, se ha observado la presencia de otras MMPs, como la 1, 3, 7, 14 y 15 [35,36].

Se ha visto que la edad y el subtipo de meduloblastoma puede afectar la EMC del tumor y la composición del microambiente tumoral, en niños con meduloblastoma SHH es común observar mayor número de infiltraciones de linfocitos en el tumor, así como la EMC se encuentra enriquecida de proteoglicanos y colágeno. En cambio, en adultos con meduloblastoma se ha visto que los inhibidores de metaloproteasas (TIMPs) se encuentran comúnmente metilados, lo que aumenta el riesgo de diseminación de las células tumorales[19,27].

Aunado a lo anterior, el meduloblastoma se ha definido como un tumor “frío”, ya que presenta poco infiltrado de células inmunes, baja inmunogenicidad con una carga mutacional pobre y un microambiente inmune altamente supresor, por lo que ha sido un reto diseñar terapias eficientes. En este contexto la inmunoterapia es una estrategia prometedora ya que ayuda al sistema inmunitario a combatir el cáncer, puede incluir varios enfoques que van desde estimular los mecanismos efectores hasta contrarrestar los mecanismos inhibidores y supresores [37,38].

## **2.4. Inmunoterapias para el meduloblastoma**

El sistema inmune tiene como función proteger al cuerpo de lesiones físicas, químicas, enfermedades, patógenos y células cancerígenas. La inmunidad innata es la primera línea de defensa, se da durante los primeros minutos u horas de exposición, no genera memoria, activa al sistema de complemento y recluta células inmunes al sitio de exposición donde inducen cascadas inflamatorias. Mientras que la inmunidad adaptativa ocurre días después a la exposición al antígeno, es una respuesta mediada por receptores específicos expresados por células T y B y genera memoria [39,40].

En el microambiente tumoral del meduloblastoma pueden encontrarse células T PD1<sup>+</sup>, lo cual ocasiona la inhibición de la activación e infiltración de células T, además, de la promoción del tumor. Por lo cual, el bloqueo de PD1 o su ligando PDL1 resulta oportuno en el tratamiento contra el cáncer, algunos de los fármacos aprobados por la FDA son nivolumab, pembrolizumab y cemiplimab. Sin embargo, la optimización de estos fármacos depende del subtipo del tumor, la etapa en la que se encuentra y las terapias combinadas [41,42].

Las células T con receptor antígeno quimérico (células T CART) son células modificadas que se dirigen directamente a los antígenos de superficie de las células malignas, cabe mencionar que este reconocimiento es independiente del MHC. La terapia ha tenido éxito en diversos tipos de tumores con baja carga mutacional, además es capaz de proporcionar inmunidad por aproximadamente 10 años [41,43]. En modelos tanto *in vitro* como *in vivo* de meduloblastoma se ha observado que las células T CART HER2-BBz (HER es un receptor con actividad de tirosina cinasa que se expresa en aproximadamente el 40% de meduloblastomas y está asociado a un peor pronóstico) pueden activar las respuestas antitumorales de células T, eliminando por completo el tumor[44].

En los últimos años también se han estudiado los agonistas de los TLRs para tratar distintos tipos de cáncer, ya que pueden estimular la respuesta inmunitaria innata y en consecuencia la adaptativa, así como tener efectos sobre el microambiente tumoral[45,46]. Se ha visto que los TLRs pueden promover la maduración de células presentadoras de antígeno y esto a su vez favorece la activación de células T y sus mecanismos antitumorales, la liberación de diversas citocinas como IL-10, IL-2, IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , la activación de vías antitumorales como NF-kB. Además, se ha visto en modelos murinos de melanoma, colon y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello que la administración de agonistas de TLRs reduce el crecimiento tumoral y en combinación con quimioterapia, radioterapia o el uso de anticuerpos, puede potenciar su efecto anticancerígeno [47–49].

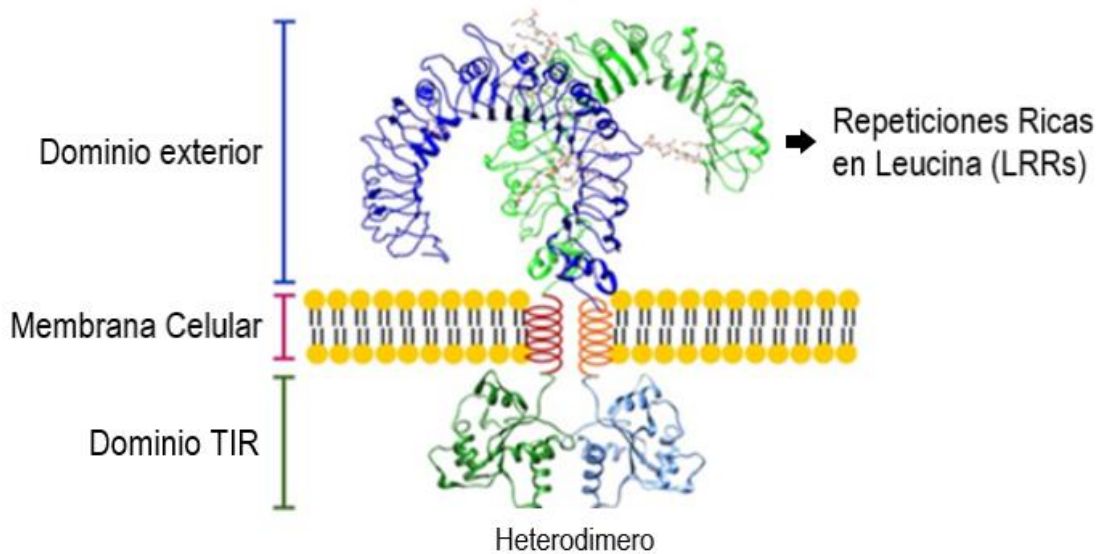
## 2.5. Receptores tipo Toll

Los TLRs son receptores transmembranales tipo I, participan en el reconocimiento de moléculas exógenas provenientes de microorganismos, denominados patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs), y en el reconocimiento de moléculas endógenas consideradas señales de alerta denominadas patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) (Tabla 1) [45,50]. En humanos se han identificado 11 TLRs mientras que en ratón se han identificado 13, sin embargo, el TLR10 no es funcional en ratón. Estos receptores pueden ser expresados por células del sistema inmune como macrófagos, células dendríticas, NK, monocitos y neutrófilos, así como en células no inmunes como epiteliales, endoteliales y fibroblastos [51,52].

TLR	MAMPs	DAMPs	Ligandos Sintéticos	Referencias
TLR1	Triacil lipoproteína	?	Pam3CSK4	[48,53–55]
TLR2	Lipoproteína	Versican	Pam2CSK4	[54–57]
TLR3	dsRNA	mRNA	Poly I:C, PolyA:U	[50,53–55]
TLR4	Lipopolisacáridos	Lipoproteínas oxidadas de baja densidad HMGB1	Derivados de lípidos A	[50,53–55,57]
TLR5	Flagelina	HMGB1	Flagelina recombinante	[50,53–55]
TLR6	Ácido lipoteicoico	Péptidos $\beta$ amiloides	lipoproteínas diaciladas sintéticas	[50,54,55,57]
TLR7	ssRNA	Complejos inmunes	Imidazoquinolina (R848) Imiquimod	[48,52–55]
TLR8	ssRNA	Complejos inmunes	Imidazoquinolina (R848)	[53–55,57]
TLR9	CpG DNA	Complejos inmunes de cromatina IgG	Oligodesoxinucleótidos CpG	[48,50,53–55,57,58]
TLR10	Diacil lipoproteína	?	?	[50,54]
TLR11	Profilina, flagelina	?	?	[53,55,57]

**Tabla 1. MAMPs, DAMPs y ligandos sintéticos de los TLRs.**

Los TLRs se pueden encontrar organizados como heterodímeros (TLR1/TLR2, TLR2/TLR6) u homodímeros (TLR2, TLR4, TLR5 y TLR11) y pueden estar localizados principalmente en la membrana celular o intracelulares en el retículo endoplásmico, endosomas y lisosomas (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9). Los TLRs se caracterizan por tener dos dominios: un dominio extracelular LRR (repeticiones ricas en leucina) que reconoce al ligando y el dominio TIR (similar al del receptor de IL-1) que va a inducir la activación de factores de transcripción involucrados en la respuesta inmune, en la proliferación celular, en la angiogénesis y en la apoptosis (Figura 3) [45,50,51].



**Figura 3. Estructura general del TLR.** Los TLRs constan de dos dominios: el dominio LRR el cual reconoce al MAMPs o DAMPs. Y el dominio TIR que recluta moléculas adaptadoras específicas que inician la cascada de señalización río abajo. Imagen modificada de El-Zayat *et al.*, [51].

### *2.5.1. Señalización de TLRs*

Una vez que el ligando se une al TLR induce cascadas de señalización intracelulares que están involucradas en distintos procesos celulares. Existen dos diferentes vías de señalización de los TLRs, una vía dependiente de MyD88 y la vía dependiente de TRIF; su activación dependerá del ligando y del TLR activado[59].

#### *2.1.1.1 Vía de señalización dependiente de MyD88*

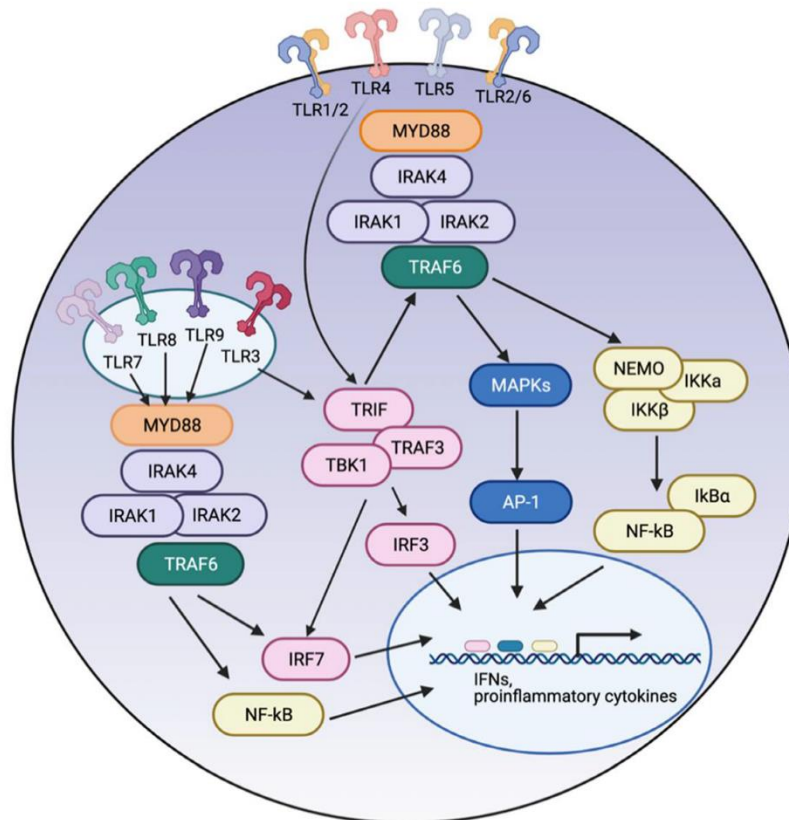
Todos los TLRs utilizan esta vía de señalización a excepción del TLR3. MyD88 es una proteína adoptadora asociada con la proteína TIR de los TLRs en la transducción de señales. MyD88 forma un complejo con la proteína quinasa IRAK-4 denominado Myddosoma. Este complejo activa a IRAK-1 que luego se autofosforila en varios sitios y conduce a la liberación de MyD88, además IRAK-1 se asocia con la ubiquitina ligasa TRAF-6 que promueve la poliubiquitinación del complejo TAK-1/TAB para activarlo. Posteriormente la activación de TAK-1 puede conducir a dos vías de señalización, la primera es a la activación de IKK-NF- $\kappa$ B, lo que permite que NF- $\kappa$ B se transloque al núcleo para inducir la expresión de genes proinflamatorios, la segunda vía es la activación de miembros de la vía MAPK como JNK, p38 y ERK, que conduce a la activación de factores de transcripción como AP-1 y la regulación de la inflamación [50,59].

#### *2.1.1.2 Vía de señalización dependiente de TRIF*

Los TLR3 y TLR4 desencadenan una vía de señalización dependiente de TRIF, sin embargo, cabe mencionar que el TLR4 es el único capaz de activar ambas vías de señalización, la de MyD88 y la de TRIF, en el caso de la vía TRIF se necesita de un



adaptador, TRAM. En el caso de la vía de MyD88, TRIF es capaz de activar a NF- $\kappa$ B mediante dos mecanismos, el primero es interactuando con TRAF6 y el segundo es por medio de la interacción con RIP, que activa a TAK1. TRIF también puede interactuar con TRAF3, con el cual puede activar al complejo TBK1/IKKi y este complejo mediante fosforilación puede activar a IRF3 e IRF7, lo cual a su vez va a inducir respuestas de interferón tipo I (Figura 4) [47,51,60].

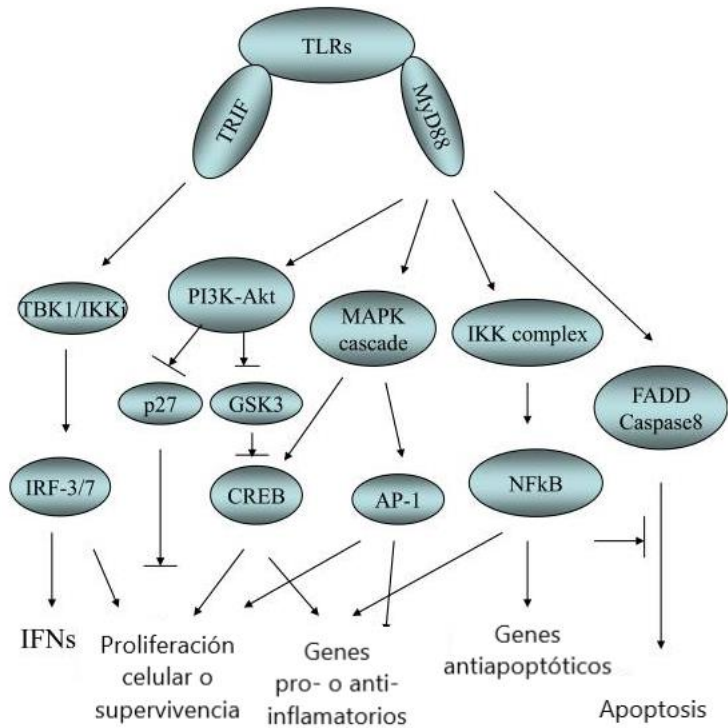


**Figura 4. Señalización de los TLRs.** Existen dos vías de señalización: la dependiente de MyD88 y la de TRIF, la vía de señalización activada dependerá del ligando, el TLR activado y la molécula adaptadora. Imagen tomada y modificada de Aluri *et al.*, [61].

### 2.1.1.3 *Procesos celulares que activan los TLRs*

Como se ha mencionado anteriormente, la señalización de los TLRs puede estar involucrada en la activación de diversos procesos celulares. Entre estos procesos se encuentra la activación del factor de transcripción NFκB, el cual a su vez activa genes implicados en la proliferación celular y en la sobrevivencia celular, incluidos como las ciclinas D1 y D2, c-Myc, c-Myb, ciclooxigenasa 2 (COX-2), BCL-2, BCL-XL y VEGF, por lo que en algunos tipos de cáncer como colon y hepatocarcinoma se ha asociado con una función protumoral [62,63]. NF-κB puede incrementar la respuesta inflamatoria mediante la producción de citocinas como IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF-α y la polarización de macrófagos M1 que a su vez van a producir citocinas inflamatorias [63]. Cabe mencionar que los TLRs también activan a la cascada de MAPK que controla la actividad de AP-1, la cual regula varios procesos celulares como la proliferación, sobrevivencia y diferenciación de tumores (Figura 5) [64].

La activación de interferones de tipo I e IRFs por parte de los TLRs regulan genes asociados con la proliferación y en especial con la apoptosis. IRF3 e IRF5 son potentes supresores de tumores e IRF7 tiene potencial oncogénico y antitumoral [62,65]. Por ejemplo, en adenocarcinoma de estómago se ha asociado que al IRF7 como un biomarcador de baja supervivencia y con un microambiente supresor de células B, neutrófilos y células dendríticas [66]. Mientras que en células de osteosarcoma se ha visto que la activación de IRF7 puede suprimir la expresión de PKM2 e inhibir la glucólisis del tumor, teniendo un efecto antitumoral [67]. En células de cáncer de colon se ha observado que la activación sostenida de IRF5 puede promover la apoptosis mediante la activación de la caspasa 8 mediante receptores de muerte (DR) como TRAIL y la proteína del dominio de muerte asociada a FAS (FADD) [68]. En este contexto, la apoptosis también puede ser desencadenada por los TLRs mediante FADD y la caspasa 8 (Figura 5) [62].



**Figura 5. Procesos activados por la señalización de los TLRs.** Los TLRs son capaces de activar diversos procesos celulares como la proliferación, apoptosis, supervivencia, e inflamación. Imagen modificada de Li et al., [62].

Los TLRs expresados en células dendríticas, favorecen su maduración, la presentación de antígeno para activar células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>, y a su vez las células T ejercen su función efectora antitumoral [47].

### 3. Antecedentes

La señalización de los TLRs rio abajo es capaz de activar eventos relacionados a la inflamación, proliferación, diferenciación y migración. Además, la activación de NF- $\kappa$ B es capaz de favorecer la transcripción de citocinas, ROS, Cox-2, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), moléculas de adhesión y coestimuladoras [47,50].

En los últimos años se ha estudiado la activación de los TLRs en diversos tipos de cáncer, sin embargo, su papel sigue siendo cuestionable. En biopsias de pacientes con cáncer cervical y células HELA se ha observado que la alta expresión de TLR8 se correlaciona con altos niveles de Bcl-2 y VEGF, por lo que concluyen que juega un importante rol en angiogénesis [69]. Yin *et al.*, 2015 estudiaron en un modelo murino de cáncer de mama que la activación de TLR7 y TLR8 por medio de un ligando sintético (R848) resulta en un potente agente anti-angiogénico, debido a la reducción en la vasculatura del tumor, inducción de apoptosis en las células tumorales y un incremento en la activación de células T CD4<sup>+</sup> [70]. Además, observaron que R848 tenía un efecto sinérgico antitumoral cuando se administraba en conjunto con sunitinib[70]. En contraste, en cáncer de páncreas la expresión de TLR7 y TLR8 se asoció con una mayor proliferación de células tumorales y quimiorresistencia[71]. Ahora bien, en algunos tipos de cáncer de cerebro y del SNC, se ha visto que la activación y expresión de los TLRs ha mostrado resultados favorables. Stathopoulos *et al.*, 2012 demostraron en un modelo de rata de glioma regresión total del tumor por medio de la activación de los TLR7 y TLR8 con ligandos sintéticos [72]. De manera similar, Benbenishty *et al.*, 2019 reportaron que la activación profiláctica del TLR9 por medio ligandos CpG reduce la metástasis a cerebro del cáncer de pulmón y melanoma debido a la activación de la microglía [73]. En meduloblastoma el estudio de los TLRs es muy limitado, hasta la fecha solo hay dos trabajos publicados, el primero fue realizado por Malinska *et al.*, 2012 donde mencionan por primera vez la expresión de los TLR2, TLR3 y TLR9 en muestras de meduloblastoma humano [74]. Posteriormente, en nuestro grupo de trabajo,

Álvarez-Arellano *et al.*, 2021 reportaron en biopsias de meduloblastoma clásicos y desmoplásticos y anaplásicos la expresión diferencial de TLR7, TLR8 y TLR9. Además, se encontró que la expresión del TLR7 es un factor pronóstico favorable de supervivencia [75]. En consecuencia, el papel que juegan los TLR7, TLR8 y TLR9 durante el desarrollo de meduloblastoma aún sigue siendo desconocido, por lo que resulta de gran interés el estudio de la activación de los TLRs con ligandos sintéticos.

#### **4. Planteamiento del problema**

El meduloblastoma es el tumor del sistema nervioso central más frecuente durante la edad pediátrica y los tratamientos convencionales que incluyen la resección quirúrgica, radioterapia y quimioterapia si bien ayudan a alargar la vida del paciente, afectan su calidad de vida. En la actualidad, se buscan alternativas terapéuticas con mayor eficacia y menor agresividad. Se sabe que la utilización de agonistas de TLRs participan en procesos como la apoptosis, la angiogénesis y la proliferación de células tumorales en diferentes tipos de cáncer, sin embargo, en el caso particular del meduloblastoma no se ha explorado. Por lo que resulta de gran interés evaluar el efecto conjunto de la vincristina con los ligandos sintéticos de TLR7/TLR8 o TLR9, durante el desarrollo del meduloblastoma como posible estrategia coadyuvante.

#### **5. Hipótesis**

En un modelo murino de meduloblastoma, el tratamiento conjunto de vincristina con los ligandos sintéticos de los TLR7/TLR8 o TLR9, será más eficaz en la disminución de la proliferación celular, aumento de la apoptosis y disminución de la angiogénesis del tumor.

## **6. Objetivos**

### *General*

Determinar el efecto de la administración de vincristina y la activación de TLR7/TLR8 o TLR9 con ligandos sintéticos sobre el desarrollo del meduloblastoma en un modelo murino.

### *Particulares*

- Determinar el efecto del tratamiento de la vincristina en combinación con la activación de TLR7/TLR8 o TLR9 sobre la proliferación del tumor.
- Establecer el efecto del tratamiento de la vincristina en combinación con la activación de TLR7/TLR8 o TLR9 sobre la apoptosis del tumor.
- Analizar el efecto del tratamiento de la vincristina en combinación con la activación de TLR7/TLR8 o TLR9 sobre la angiogénesis del tumor.

## **7. Metodología**

### **7.1. Cultivo celular**

La línea celular Daoy [ATCC, Cat. HTB-186™] proveniente de meduloblastoma humano se cultivó en medio Eagle mínimo esencial (EMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino y penicilina/estreptomicina, y se mantuvo a 37°C en un ambiente de 5% CO<sub>2</sub> y 5% de humedad.

## 7.2. Modelo murino

Se obtuvieron ratones inmunodeficientes nu/nu, machos de 6-8 semanas del Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, a los cuales se les indujo la formación del tumor por medio de la inoculación subcutánea de la línea celular Daoy ( $9 \times 10^5$  células). Cada semana se documentó el peso del ratón y se midió el tamaño del tumor. Los ratones se mantuvieron en un rack ventilado en condiciones de aislamiento microbiológico y aire filtrado en el bioterio del Hospital Infantil de México "Federico Gómez" (HIMFG).

Se dividió a los animales en 4 grupos experimentales: S/Tx (n=6), Vincristina [Sigma Aldrich, Cat. V8879-5MG] (n=5), vincristina+R848 [Miltenyi Biotec] (n=5) y vincristina+ODN [Miltenyi Biotec] (n=5). Cabe mencionar que se calculó el número mínimo de ratones por cada grupo experimental de acuerdo con la literatura citada[76]. Cuando los tumores alcanzaron una longitud de 30-1700 mm<sup>3</sup>, se les administró vía intraperitoneal vincristina [1.2 mg/kg], y vía intratumoral R848 [5 µg], y ODN clase B [5 µg], según correspondía con el grupo experimental. Todos los tratamientos fueron administrados una vez por semana durante dos semanas. Al término del tratamiento los ratones se sacrificaron por medio de dislocación cervical y el tumor se extrajo y se pesó. A continuación, el tumor se dividió en dos partes, una para el análisis por inmunohistoquímica y otra para análisis de proteína.

El volumen del tumor se calculó por medio de la siguiente formula, para tumores no esféricos:  $V=W \times L/2$  y para tumores esféricos:  $V=4/3 \times \pi r^3$ , donde W=ancho, L=largo, r=radio.

## 7.3. Inmunohistoquímica

Los tumores se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 4 días a 4°C y posteriormente, se rehidrataron en sacarosa al 30% con 0.01% de azida de sodio

en PBS. A continuación, se realizaron cortes de 30  $\mu\text{m}$  de grosor y se mantuvieron en sacarosa al 30% con 0.01% de azida de sodio en PBS a 4°C.

Los tejidos se lavaron dos veces con PBST (PBS+0.25% de Tritón) durante 5 minutos, se realizó la recuperación antigénica por medio de baño maría con solución de citrato de sodio a 10 mM durante 7 minutos, posteriormente se preincubaron los tejidos en 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  en metanol durante 30 segundos. Después, se lavaron 2 veces con PBST durante 5 minutos, y se colocaron durante 30 minutos en PBST con 1% de albumina bovina. Posteriormente se dejaron incubando toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario anti-Ki-67 [Abcam, Cat. Ab15580 1:500]. Una vez incubadas las muestras, se lavaron 2 veces con PBST durante 5 minutos, se incubaron con su anticuerpo secundario durante 1 hora, a temperatura ambiente y se volvieron a lavar 2 veces con PBST por 5 minutos. Finalmente se incubaron con 3,3'-diaminobezina tetrahydrochloride (DAB) durante 1 minuto y se tiñeron con hematoxilina para contrastar la tinción. La cuantificación del porcentaje del área positiva se realizó por medio del programa de Image J 1.53k [2022].

#### **7.4. Extracción y cuantificación de proteínas**

La mitad del tumor designada para proteína se congeló a -70°C hasta el momento de su utilización. Para la extracción de la proteína se preparó una mezcla con 1000  $\mu\text{L}$  de regulador para extracción de proteínas [Millipore, cat. CytoBuster™ 71009-50ML], 10  $\mu\text{L}$  de EDTA [Monterrey, Cat. 0580] y 10  $\mu\text{L}$  del inhibidor de proteasas [Millipore, Cat. 20-201], de la mezcla se agregaron 350  $\mu\text{L}$  a cada muestra de tumor, luego se homogenizaron con ayuda de un pistilo. Posteriormente, se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se mantuvo a -20°C. Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford.



## **7.5. Western-blot**

Se realizó un gel de poliacrilamida al 12% y se cargó cada pozo con 75 µg de proteína de cada uno de los tratamientos, posteriormente el gel se corrió a 80 volts durante 90 minutos. Una vez terminada la corrida del gel, se transfirió a una membrana de fluoruro de polivinilideno [PVDF, Millipore, Cat. IPVH00010], la cual se colocó en una cámara húmeda para western blot [Bio-rad, modelo Mini PROTEAN®Tetra Cell] y se inició la transferencia a 300 mA durante dos horas. El bloqueo de la membrana se realizó con leche al 5% disuelta en TBS-T durante 1 hora para caspasa 3 activa y 2 horas para VEGF, en agitación constante y a temperatura ambiente. Se lavó la membrana 3 veces con TBS-T durante 5 minutos. Seguidamente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios usados fueron caspasa 3 [Novus Biologicals, Cat. 31A1067, 1:5000], actina [Abcam, Cat. Ab179467, 1:7000] y VEGF [Abcam, Cat. Ab51745, 1:1000]. La membrana se lavó 3 veces con TBS-T y se dejó incubando con el anticuerpo secundario para caspasa 3 se utilizó anti-mouse IgG-HRP mientras que para actina y VEGF se utilizó anti-rabbit IgG-HRP correspondiente durante 2 horas, en agitación constante y a temperatura ambiente. Una vez terminada la incubación del anticuerpo secundario, la membrana se lavó 3 veces con TBS-T y se bañó durante 5 minutos con los dos reactivos de luminol [Santa Cruz Biotechnology, Cat. SC-2048]. Las membranas se revelaron en un fotodocumentador [Vilber, Fusion Solo S], y se analizaron con Image J 1.53k [2022].

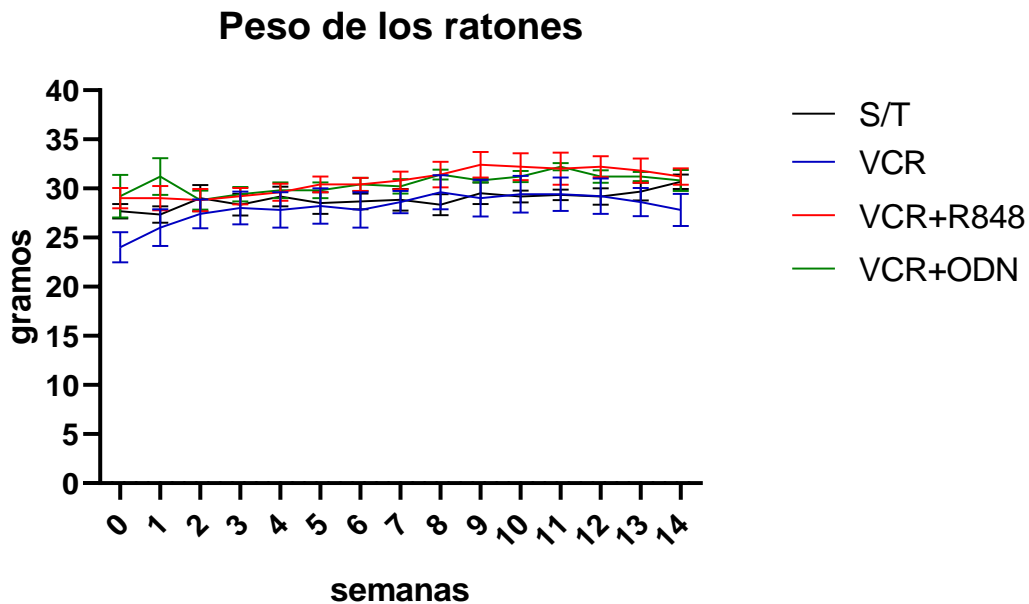
## **7.6. Análisis estadístico**

Para determinar las diferencias significativas entre los grupos experimentales se utilizó la prueba de ANOVA de una vía con una prueba de comparación simple de LSD o la prueba de comparación de Tukey o la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis según fue el caso, usando el software de GraphPad Prism 8.0.1 [2018].

## 8. Resultados

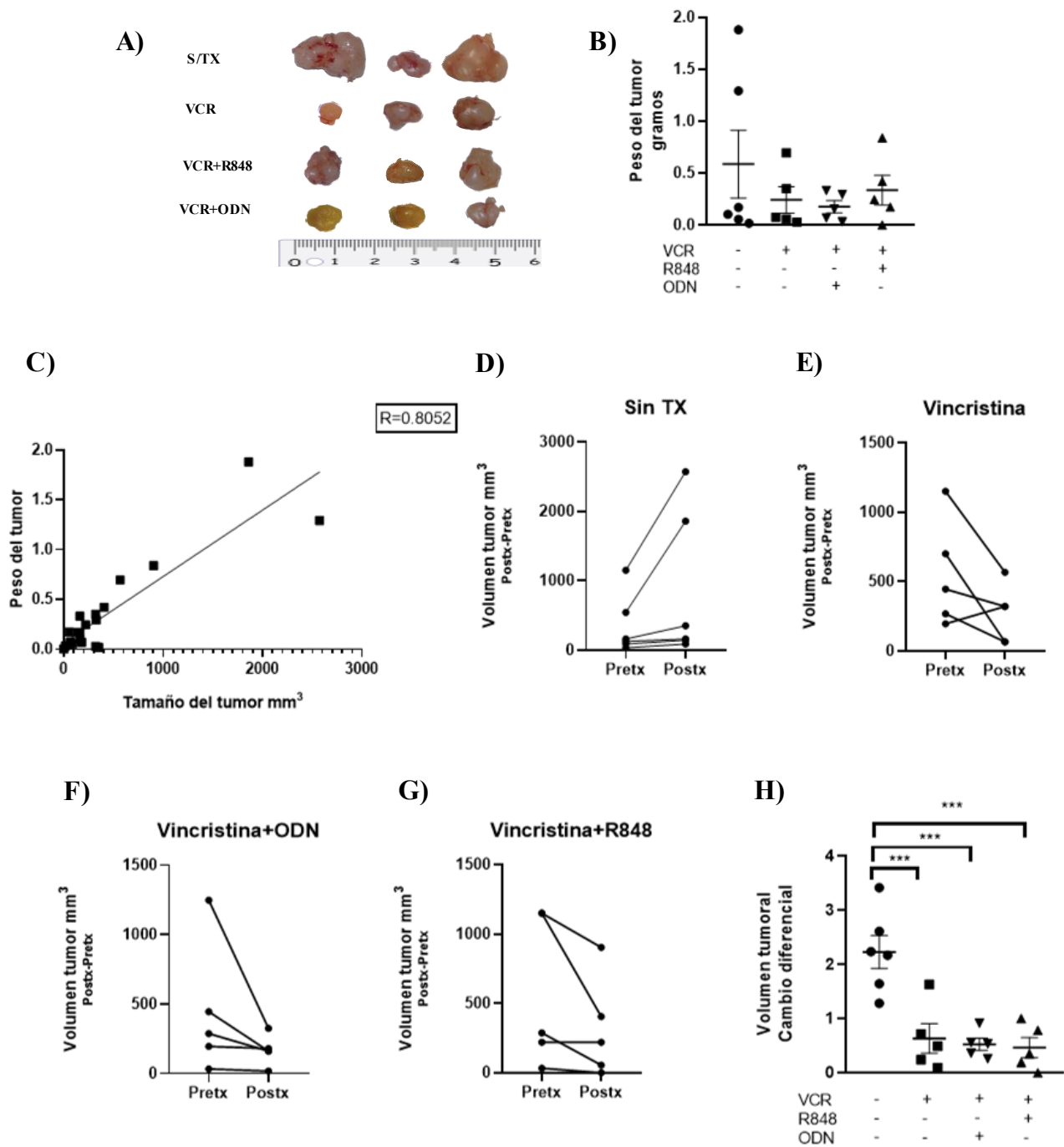
### 8.1. La administración conjunta de la vincristina con R848 y ODN no presenta un efecto sinérgico sobre la disminución del tamaño del tumor

Ya que el peso es un indicador de la salud de los animales, los ratones se pesaron cada semana durante todo el experimento. En la Figura 6 se observa que el peso de los ratones se mantuvo constante en todos los grupos de tratamiento a lo largo del experimento.



**Figura 6. Seguimiento semanal del peso de los ratones.** El peso de los ratones fue monitoreado a lo largo de todo el experimento. En la semana 0 se inocularon las células HTB-186 y en la semana 12 y 13 se administró la vincristina y los ligandos de TLR7/TLR8 y TLR9.

Una vez terminado los tratamientos de los diferentes grupos experimentales, se extrajeron los tumores de los ratones (Figura 7A). Los tumores se pesaron, sin embargo, no se encontraron diferencias entre los tratamientos (Figura 7B). Debido a que se ha observado que el tamaño o peso del tumor puede verse afectado por zonas hipóxicas, necróticas o acumulación de agua, se realizó un análisis de correlación entre el tamaño y peso del tumor (Figura 7C), y se encontró una correlación positiva entre ambos factores, lo que significa que, a mayor tamaño, mayor peso del tumor. Además, se midió el tamaño del tumor antes y después del grupo sin tratamiento, con vincristina o vincristina con ligandos sintéticos de TLR7/8 y TLR9 (Figura 7D-G). Nuestros resultados muestran un incremento esperado en el tamaño del tumor del grupo S/Tx, mientras que los ratones tratados con vincristina o vincristina con los ligandos sintéticos de TLR7/8 y TLR9, disminuyó el tamaño del tumor. Además, se encontraron diferencias significativas entre los grupos S/Tx y vincristina, vincristina+R848 y vincristina+ODN, pero no entre el grupo tratado con vincristina y los grupos tratados con vincristina y con los ligandos sintéticos de TLR7/8 y TLR9 (Figura 7H).



**Figura 7. Efecto del tratamiento con vincristina o vincristina con R848 y ODN sobre el volumen tumoral.** Imágenes representativas de los tumores de los grupos experimentales (A). Peso del tumor (B). Correlación entre el tamaño y el peso del tumor (C).

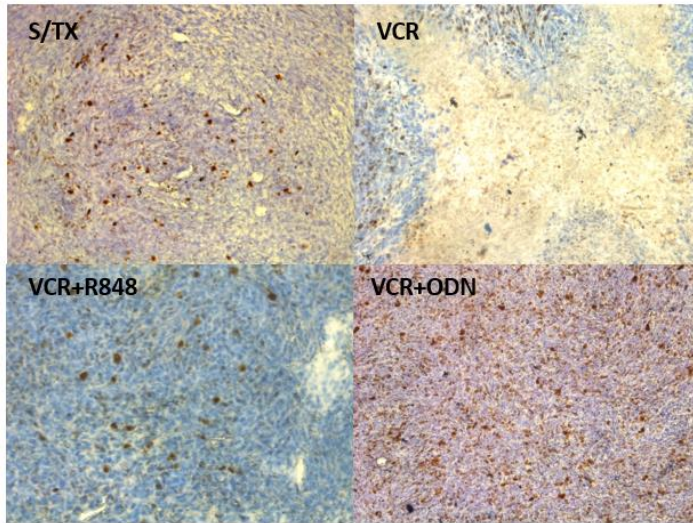
Volumen del tumor antes y después del tratamiento; sin tratamiento (D), vincristina (E), vincristina + ODN (F) y vincristina + R848 (G). Cambio del volumen tumoral después de los tratamientos (H). El cambio del volumen tumoral se calculó tomando en cuenta el tamaño del tumor antes del tratamiento = 1, mediante la siguiente fórmula: cambio del volumen tumoral = (volumen final x 1) / volumen inicial.  $\pm$ SEM, \*\*\* $p < 0.01$ , (ANOVA de una vía y Tukey).

## **8.2. La administración conjunta de vincristina con R848 y ODN aumenta la proliferación de las células tumorales.**

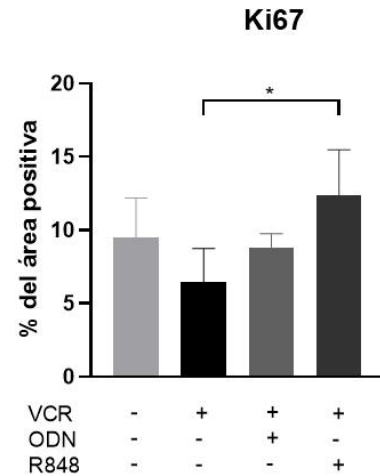
Posteriormente decidimos evaluar la proliferación celular en los tumores extraídos de los ratones mediante la expresión de Ki-67 por inmunohistoquímica. Ki-67 es una proteína nuclear que se encarga de regular el ciclo celular y su expresión aumenta durante la fase G1, por lo que es un marcador de proliferación ampliamente utilizado en diversas patologías como tumores [77,78]. En el presente trabajo encontramos que el tratamiento con vincristina disminuye la expresión de Ki-67 en comparación con el grupo sin tratamiento (

Figura 8A y 8B), lo cual era lo esperado, ya que como se mencionó anteriormente, la vincristina interviene con la formación de los microtúbulos durante el ciclo celular. Sin embargo, los tumores tratados con vincristina y los ligandos sintéticos de TLR7/TLR8 o TLR9 parece tener un efecto protumoral, ya que la expresión de Ki-67 es mayor cuando solo se administra la vincristina (Figura 8B), inclusive el tratamiento de vincristina+R848 presentó un aumento estadísticamente significativo en la expresión de Ki-67 con respecto al tratamiento únicamente con vincristina (Figura 8B). Por lo que, el tratamiento conjunto de vincristina con los ligandos sintéticos de TLR7/TLR8 o TLR9 aumenta la proliferación de las células tumorales en comparación a cuando solo se administra vincristina.

A)



B)

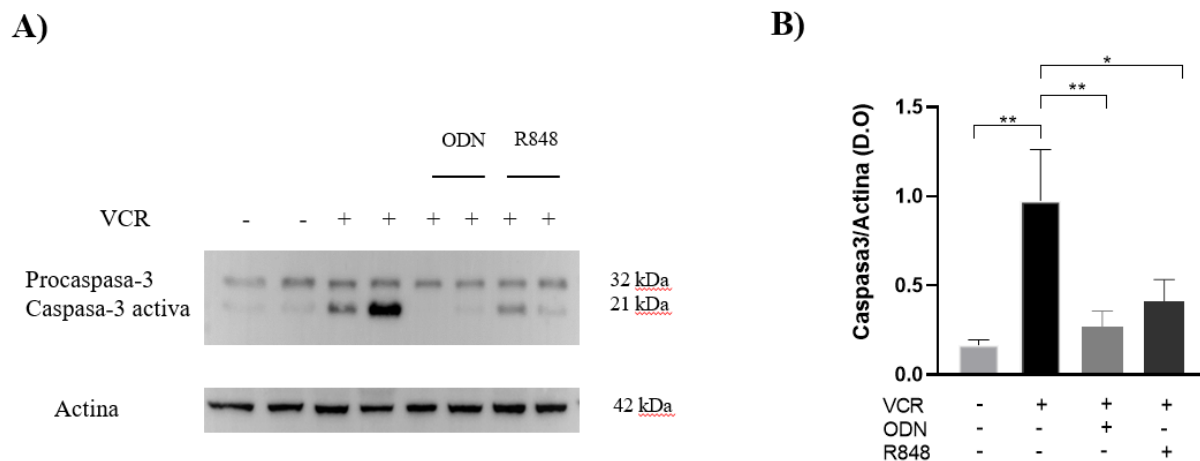


**Figura 8. Expresión del marcador de proliferación Ki67 en los tumores tratados con vincristina o vincristina con R848 y ODN.** Imágenes representativas de las inmunohistoquímicas para Ki-67 contrastadas con hematoxilina (A). Sin tratamiento (i), vincristina (ii), vincristina+ODN (iii), vincristina+R848 (iv). Tinción marrón, células positivas para Ki67. Cuantificación del porcentaje del área positiva para Ki-67 de los tumores (B). Mediana  $\pm$  rango, \* $p < 0.05$ , (Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis),  $n \geq 3$ .

### 8.3. La vincristina en combinación con R848 y ODN no incrementa la muerte por apoptosis de las células tumorales.

La vincristina interrumpe el ciclo celular, lo cual induce apoptosis, siendo este el principal mecanismo por el cual disminuye el tamaño tumoral. Por lo que, se decidió evaluar la apoptosis empleando como marcador la caspasa-3 activa. Encontramos que efectivamente la vincristina indujo significativamente un incremento de la caspasa-3 activa en comparación con el grupo sin tratamiento (Figura 9A y 9B). Además, se encontró que el tratamiento conjunto de la vincristina con R848 o el ODN, disminuyeron significativamente la caspasa-3 activa en comparación con el

tratamiento de solamente vincristina (Figura 9B). Lo cual indica que el tratamiento de vincristina y los ligandos de TLR7/TLR8 y TLR9 podría tener un efecto protumoral, ya que aumentan la proliferación y disminuyen la apoptosis del tumor, con respecto al grupo tratado con la vincristina únicamente.

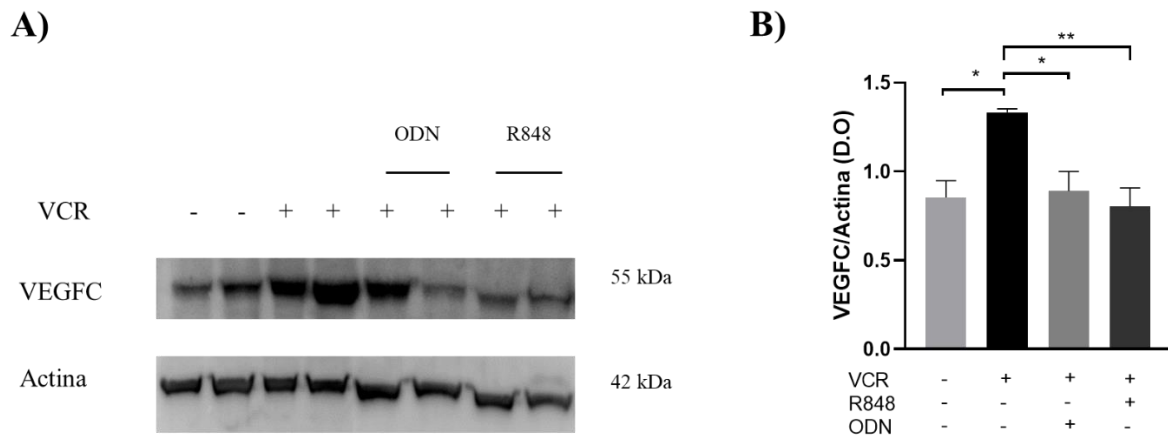


**Figura 9. Efecto del tratamiento conjunto de la vincristina con los ligandos sintéticos de los TLRs sobre la expresión de caspasa-3.** Geles representativos de dos tumores de la expresión de procaspasa-3, caspasa-3 y actina (A). Cuantificación de la expresión de caspasa-3 activa (21 kDa) (B). Densidad óptica D.O.  $\pm$  SEM, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , (ANOVA de una vía y LSD),  $n \geq 3$ .

#### 8.4. Efecto del tratamiento con vincristina en combinación con R848 y ODN sobre la expresión de VEGF-C en los xenotransplantes

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos preexistentes, en el cáncer es un proceso importante debido a que los vasos sanguíneos proporcionan los nutrientes necesarios para el crecimiento y metástasis

del tumor [79]. Debido a que el tratamiento conjunto de vincristina con los ligandos sintéticos de TLR7/TLR8 o TLR9 presenta mayor proliferación y menor apoptosis de células tumorales, se decidió evaluar el efecto de los diferentes tratamientos sobre la angiogénesis del tumor. Observamos que el tratamiento con vincristina fue el que presentó mayor expresión de VEGF-C. Resulta interesante observar la misma tendencia que en la proliferación y apoptosis del tumor, ya que cuando se administra la vincristina con los ligandos de TLR7/8 y TLR9, la expresión de VEGF-C disminuye significativamente respecto al tratamiento con vincristina, siendo una expresión similar de VEGFC al grupo sin tratamiento (Figura 10A y 10B).



**Figura 10. Evaluación de la vascularización del tumor de los ratones con meduloblastoma sin tratamiento, tratados con vincristina o vincristina con R848 y ODN.** Geles representativos dos tumores de la expresión de VEGFC y actina (A). Cuantificación de la expresión de VEGFC (55-70 kDa) (B). Densidad óptica D.O.  $\pm$  SEM, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (ANOVA de una vía y LSD),  $n \geq 3$ .



## 9. Discusión

Los tratamientos actuales para el meduloblastoma tienen desventajas y efectos secundarios sobre los pacientes, y los que sobreviven tienen una menor calidad de vida [24,25]. Por lo cual, en los últimos años es un punto de interés la búsqueda de terapias coadyuvantes que disminuyan los efectos secundarios del tratamiento actual para el meduloblastoma. El uso de la inmunoterapia ha resultado beneficioso en diversos tipos de cáncer, sin embargo, en cánceres de cerebro sigue siendo un reto debido a la falta de antígenos inmunogénicos, a los pocos infiltrados celulares y al microambiente altamente inmunosupresor [37,38]. Además, se ha visto que el uso de la inmunoterapia junto con la quimioterapia y radioterapia puede tener un efecto sinérgico [11]. En este contexto, la activación de los TLRs podría ser una terapia adyuvante prometedora contra el meduloblastoma.

En el presente trabajo se observó que la administración conjunta de la vincristina con los ligandos de TLRs no presentó un efecto sinérgico sobre la disminución del tumor (Figura 11). Ya que los tumores disminuían su tamaño debido únicamente al efecto de la vincristina. Estos resultados pueden deberse a la concentración empleada de los ligandos, así como a la frecuencia y número de dosis administradas. Como los hallazgos reportados en un modelo murino de glioma, en el que encontraron que a dosis menores a 10 µg de R848 no tenían ningún efecto sobre el tamaño del tumor [72]. Por otro lado, Figueiredo *et al.*, 2021 observaron en un modelo de ratón ortotópico de cáncer de mama que la administración intraperitoneal de nanopartículas de lignina cargadas con R848 y vinblastina presenta un efecto sinérgico en la disminución del tamaño y peso del tumor, sin embargo, cuando se administra vinblastina con R848 sin las nanopartículas de lignina no presenta ningún efecto sinérgico sobre el tamaño o peso del tumor [80]. De manera similar, se ha visto en un modelo murino de glioma que la administración de R848, sin nanopartículas de ciclodextrina, no presenta un efecto significativo sobre el tamaño del tumor [81]. Ya que se ha observado que cuando se administra solo el R848 la biodisponibilidad y efectividad del fármaco disminuye, por lo que es

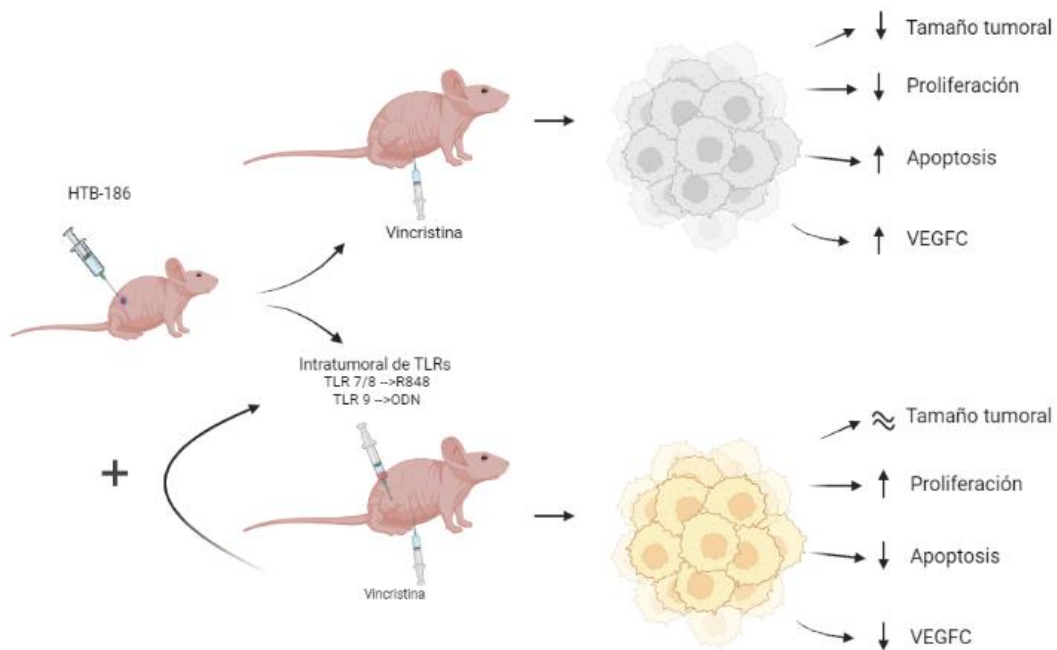
necesario administrar mayores dosis o considerar si la vía de administración es la óptima [80–82].

Como se mencionó anteriormente, la señalización de los TLRs está implicada en diversos procesos celulares como la proliferación, apoptosis y angiogénesis [45,50,51]. Por lo que se evaluó la proliferación y apoptosis del tumor ya que, aunque no se observó un efecto sinérgico en la disminución del tamaño del tumor cuando se administra el tratamiento conjunto de la vincristina y los ligandos sintéticos de TLR7/TLR8 o TLR9, esto no necesariamente indica a que el tratamiento no tenga efecto sobre el tumor.

Nosotros observamos que la combinación de vincristina con el ligando sintético de TLR7/TLR8 o TLR9 mostró una mayor proliferación y menor apoptosis que cuando solo se administró el tratamiento con vincristina (Figura 11), siendo estos valores parecidos a los del grupo sin tratamiento. Estos resultados son similares a los encontrados por Grimming *et al.*, 2015 en donde observaron que la estimulación de R848 en células de páncreas aumentaba la proliferación celular, aunado a que la sobreexpresión de TLR7 y TLR8 favorecía la quimiorresistencia al 5-fluoracilo [71]. Cherfils-Vicini *et al.*, 2010 observaron en células de cáncer de pulmón que la estimulación de TLR7 y TLR8 por medio de ligandos sintéticos provee quimiorresistencia a ciclohexamida, cisplatino, carboplatino, doxorubicina (genérico de adriamicina) y navelbine (alcaloide de la vinca) a través de la vía dependiente de MyDD88 que activa a NF- $\kappa$ B y que a su vez favorece el aumento de la expresión de BCL-2, una proteína anti-apoptótica, además de aumentar las capacidad de migración y metástasis mediante la expresión de CCR4, FN1 (fibronectina 1) [83].

El TLR9 también juega un rol importante en el desarrollo del cáncer, en células de osteosarcoma se ha visto que la sobreexpresión de TLR9 promueve la proliferación celular, el ciclo celular, invasión y migración a través de la vía de señalización de NF- $\kappa$ B, mientras que su silenciamiento tiene el efecto opuesto [84]. En células de cáncer de ovario SKOV3 se ha observado que la administración de ODN produce quimiorresistencia a cisplatino, así como la inhibición de TLR9 sensibiliza a las células tumorales disminuyendo los niveles de MRP (proteína asociada a resistencia

multidrogas), p53, y favorece la autofagia [85]. Tanaka *et al.*, 2010 demostraron que la estimulación del TLR9 por medio de ODN en células de hepatocarcinoma promueve la viabilidad celular a adriamicina o cisplatino por medio de la activación de inhibidores de la apoptosis [86]. La utilización de adriamicina en células tumorales disminuye inhibidores apoptóticos como survivin, Bcl-xl, XIAP, cFLIP, pero cuando se utiliza adriamicina en combinación con ODN CpG estos inhibidores apoptóticos aumentan [86]. Esto podría ser una explicación de porque en nuestros resultados obtuvimos mayor proliferación y menor apoptosis cuando se utiliza el tratamiento conjunto de vincristina con el ligando de TLR7/8 o TLR9 en comparación de cuando solo se utiliza vincristina (Figura 12).



**Figura 11. Efecto de la administración de vincristina o vincristina con los ligandos de TLR7/8 o TLR9 en un modelo murino de meduloblastoma.** La administración de vincristina disminuyó el tamaño tumoral y la proliferación, aumentó la apoptosis y VEGFC, mientras que la administración conjunta de vincristina con los ligandos de TLR7/8 o TLR9 no presentó un efecto sinérgico sobre el tamaño tumoral, la proliferación aumentó y la apoptosis y expresión de VEGFC del tumor disminuyó.

Por otro lado, se sabe que el VEGF está encargado de regular el proceso de vascularización y angiogénesis, VEGF es una familia de factores de crecimiento que incluye varios miembros (VEGF A-F) y factor de crecimiento placentario (PIGF) [87]. VEGF-C en cáncer induce la formación de vasos linfáticos y proporciona las rutas necesarias para que las células tumorales inicien el proceso de metástasis [88]. En un modelo murino de cáncer de colon no metastásico se ha observado que la sobreexpresión de VEGF-C correlaciona con un mayor número y tamaño de los tumores, mayor número de vasos linfáticos además promueve el reclutamiento de TAMs que favorecen la inmunosupresión, disminuyendo células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> [89]. En el presente trabajo observamos el efecto contrario del VEGF-C, en tumores con mayor grado de proliferación y menor apoptosis pertenecientes al grupo de vincristina con los ligandos de TLR7/TLR8 o TLR9 se encontró una disminución significativa en la expresión de VEGF-C, siendo similar a la del grupo sin tratamiento, mientras que el grupo al que solamente se administró vincristina aumento significativamente la expresión de VEGF-C (Figura 11). Nuestros resultados son similares a los observados por un estudio reciente, donde demostraron que el VEGF-C es un regulador negativo del crecimiento de meduloblastoma, ya que observaron en células DAOY mayor expresión de VEGF-C en comparación de células HD-MB03 del subgrupo 3 del meduloblastoma, las cuales son células más agresivas y metastásicas [90]. Aunado a que en ratones inmunodeficientes con xenoinjertos de células DAOY deficientes de VEGF-C, se observaron tumores de mayor tamaño y agresividad en comparación con los tumores de las células DAOY que expresan VEGF-C [90]. De manera similar, en un modelo murino de glioblastoma se observó que la administración profiláctica de VEGF-C promueve el rechazo del tumor, además de proporcionar memoria inmunológica mediante la promoción de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> ante una reexposición a células de glioblastoma en el ratón [91]. Por lo que en tumores del SNC, VEGF-C podría estar modulando el crecimiento y metástasis del tumor [90,91].

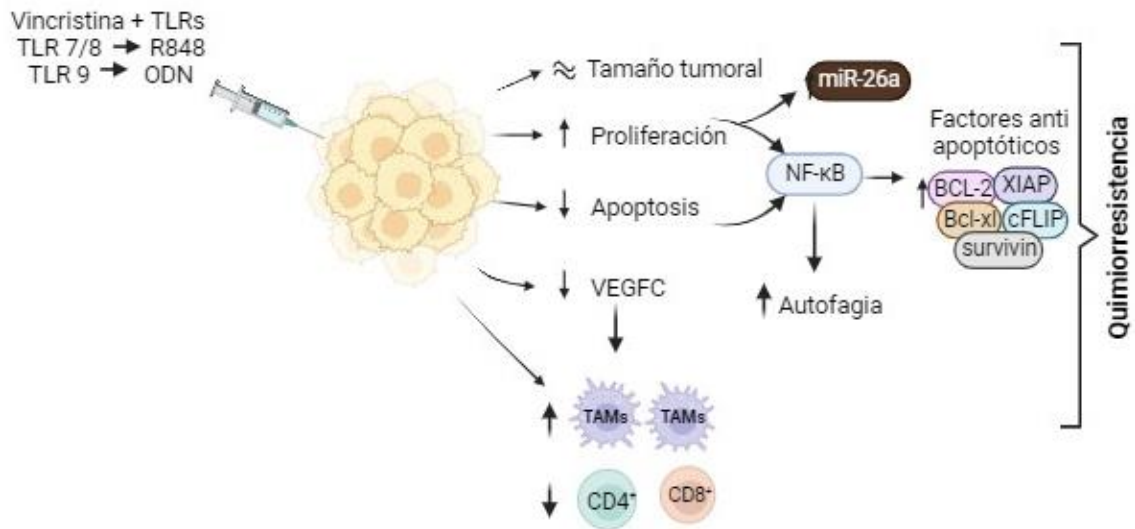
Aunque la administración conjunta de vincristina con R848 y ODN no proporcionó el efecto sinérgico antitumoral deseado, estos resultados son importantes ya que podríamos estar observando un mecanismo de quimiorresistencia de las células tumorales. Sin embargo, se requieren otros estudios para comprobarlo. Existen varios mecanismos por los cuales se podrían estar favoreciendo la quimiorresistencia como la activación de genes anti apoptóticos como Bcl-2 o AKT, o la represión de genes apoptóticos como Bax o Bak, los cuales pueden ser activados mediante la señalización de NF- $\kappa$ B, factor de transcripción activado por la señalización de TLRs (Figura 12) [92,93]. En células de cáncer de colon quimio resistentes a 5-fluoracilo se ha visto que la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B se encuentra altamente fosforilada y que la inhibición de la vía de NF- $\kappa$ B revierte su quimiorresistencia [94].

La activación de factores anti apoptóticos o proliferativos en el cáncer, también pueden ser regulados por miRNA, que son pequeños RNAs monocatenarios no codificantes, los cuales desempeñan un rol importante en la regulación de la expresión génica, y pueden estar involucrados en la quimiorresistencia [93,95]. Se ha observado que la señalización de TLRs puede favorecer la expresión de miRNA, en un modelo murino de cáncer de pulmón la estimulación del TLR9 por medio de ODN aumentó la expresión de miR-26a, el cual promueve el crecimiento y migración de las células tumorales por medio de la vía PI3K-Akt (Figura 12) [96].

Otro mecanismo de quimiorresistencia es la autofagia, que es la degradación de organelos dañados o proteínas mal plegadas, en el cáncer la autofagia puede proporcionar la energía a las células tumorales y favorecer la metástasis [97,98]. Se ha visto que la estimulación de TLR7, TLR8 o TLR9 con ligandos como imiquimod, RNAs de cadena sencilla u ODN, puede desencadenar el proceso de autofagia (Figura 12) [99–101]. Y en células de cáncer de cerebro como glioblastoma o meduloblastoma se ha observado que la inhibición de la autofagia puede reducir significativamente la capacidad proliferativa e invasiva de las células tumorales [102,103].

El microambiente tumoral juega un rol importante en el desarrollo del tumor y en la quimiorresistencia, en este contexto se ha visto que la administración de ligandos sintéticos de TLR7/TLR8 o TLR9 puede influir en el reclutamiento de células inmunes en el tumor. En un modelo murino de cáncer de páncreas se ha visto que la administración de ligandos de TLR7 favorece el desarrollo tumoral, al reducir el infiltrado de linfocitos T y aumentar el número de TAMs CD86<sup>+</sup>/204<sup>+</sup> [104]. Así como en modelo murino de adenocarcinoma de pulmón, los ligandos sintéticos de TLR7 favorecen el crecimiento tumoral mediante la remodelación del microambiente tumoral, el reclutamiento de células mieloides supresoras por la inducción de CCL2 y GM-CSF y el aumento de genes asociados a la transición epitelio mesénquima [105]. De manera similar, se ha observado que la administración de ODN en ratones de cáncer de colon promueve el desarrollo tumoral y la radio resistencia debido al reclutamiento de células mieloides por medio de la señalización de TLR9/IL-6/SAT3 [106]. Se ha visto que el reclutamiento TAMs y células mieloides en el microambiente tumoral se ha asociado como un mecanismo de quimiorresistencia al promover factores de crecimiento y proteasas que promueven la invasión (Figura 12) [107].

Por lo que es necesario realizar más estudios para poder dilucidar el o los mecanismos que podrían estar promoviendo la quimiorresistencia cuando se administra la vincristina con los ligandos sintéticos de TLR7/TLR8 o TLR9 en un modelo murino con meduloblastoma.



**Figura 12. Mecanismos que podrían estar involucrados en la posible quimiorresistencia desencadenada por la administración de vincristina con los ligandos de TLR7/8 o TLR9.** Los ligandos sintéticos de TLR7/8 o TLR9 podrían favorecer la quimiorresistencia de las células tumorales mediante la activación de miR-26a que promueve procesos de proliferación e invasión, y/o la activación de la vía de NF-κB que puede activar factores anti apoptóticos y aumentar la autofagia. Además, la disminución de la expresión de VEGFC podría afectar la respuesta del sistema inmune adaptativo al aumentar TAMs y disminuir el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> [91–93,96,102–104,107]. Imagen creada en *biorender*.

## 10. Conclusión

En el presente trabajo se observó en un modelo murino de meduloblastoma, que la vincristina disminuye el tamaño del tumor, así como la proliferación celular y aumenta la apoptosis y expresión de VEGF-C. Sin embargo, el tratamiento conjunto de vincristina con los ligandos sintéticos de TLR7/TLR8 o TLR9, no presenta un efecto sinérgico sobre la disminución del tamaño del tumor. Contrario a lo esperado aumenta la proliferación celular, disminuye la apoptosis y la expresión de VEGF-C.

Es necesario realizar más estudios para comprender de mejor manera el mecanismo por el cual TLR7/TLR8 o TLR9 en combinación con la vincristina favorecen el desarrollo del tumor. Cabe mencionar que los resultados encontrados en el presente trabajo son muy importantes, ya que hasta la fecha existen muy pocos trabajos acerca del papel de TLR7, TLR8 y TLR9 en combinación con la quimioterapia en el desarrollo del cáncer, mientras que en el meduloblastoma aún no se había explorado.



## 11. Perspectivas

1. Determinar el efecto que tendría incrementar el número de dosis y/o las concentraciones de los ligandos de TLR7/TLR8 o TLR9 en conjunto con la vincristina el meduloblastoma sobre la proliferación celular, apoptosis y angiogénesis del tumor.
2. Observar el efecto de la administración de los ligandos de TLR7/TLR8 o TLR9 en el meduloblastoma anterior o posterior al tratamiento con vincristina sobre la proliferación celular, apoptosis y angiogénesis del tumor.
3. Analizar la expresión de NF- $\kappa$ B y factores anti apoptóticos como BCL-2, Bcl-xl, XIAP, cFLIP y survivin en el tumor tratado con vincristina o vincristina en combinación con la activación de TLR7/TLR8 o TLR9.

## 12. Referencias Bibliográficas

- [1] Medulloblastoma Diagnosis and Treatment - NCI, (n.d.). <https://www.cancer.gov/rare-brain-spine-tumor/tumors/medulloblastoma> (accessed March 13, 2023).
- [2] J.M. Kocarnik, K. Compton, F.E. Dean, W. Fu, B.L. Gaw, J.D. et al., Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life Years for 29 Cancer Groups From 2010 to 2019 A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019, *JAMA Oncol.* **8** (2022) 420–444. doi:10.1001/jamaoncol.2021.6987.
- [3] Cancer, (n.d.). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed March 21, 2023).
- [4] R.L. Siegel Mph, K.D. Miller, N. Sandeep, W. Mbbs, | Ahmedin, J. Dvm, and R.L. Siegel, Cancer statistics, 2023, *CA Cancer J Clin.* **73** (2023) 17–48. doi:10.3322/CAAC.21763.
- [5] Cancer Today, (n.d.). [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-dual-bars-2?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=regions&population=250&populations=250&key=asr&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=10&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=0&include\\_nmsc\\_other=1&dual\\_distribution=1&population1=250&population2=554&show\\_values=false&type\\_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&type\\_sort=0](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-dual-bars-2?v=2020&mode=cancer&mode_population=regions&population=250&populations=250&key=asr&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=10&group_cancer=1&include_nmsc=0&include_nmsc_other=1&dual_distribution=1&population1=250&population2=554&show_values=false&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&type_sort=0) (accessed March 21, 2023).
- [6] S. Subramanian, and T. Ahmad, Childhood Brain Tumors, *StatPearls.* (2022). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535415/> (accessed March 21, 2023).

- [7] I.F. Pollack, S. Agnihotri, and A. Broniscer, Childhood brain tumors: current management, biological insights, and future directions, *J Neurosurg Pediatr.* **23** (2019) 261. doi:10.3171/2018.10.PEDS18377.
- [8] C. Thorbinson, and J.P. Kilday, Childhood Malignant Brain Tumors: Balancing the Bench and Bedside, *Cancers (Basel)*. **13** (2021). doi:10.3390/CANCERS13236099.
- [9] A.J. Gajjar, and G.W. Robinson, Medulloblastoma—translating discoveries from the bench to the bedside, *Nature Reviews Clinical Oncology* 2014 11:12. **11** (2014) 714–722. doi:10.1038/nrclinonc.2014.181.
- [10] T. Cooney, H. Lindsay, S. Leary, and R. Wechsler-Reya, Current studies and future directions for medulloblastoma: A review from the pacific pediatric neuro-oncology consortium (PNO) disease working group, *Neoplasia*. **35** (2023) 100861. doi:10.1016/J.NEO.2022.100861.
- [11] H. Maier, T. Dalianis, and O.N. Kostopoulou, New Approaches in Targeted Therapy for Medulloblastoma in Children, *Anticancer Res.* **41** (2021) 1715–1726. doi:10.21873/ANTICANRES.14936.
- [12] P.Y. Wen, and J.T. Huse, 2016 World Health Organization Classification of Central Nervous System Tumors, *Continuum (Minneap Minn)*. **23** (2017) 1531–1547. doi:10.1212/CON.0000000000000536.
- [13] P. Diamandis, and K. Aldape, World Health Organization 2016 Classification of Central Nervous System Tumors, *Neurol Clin.* **36** (2018) 439–447. doi:10.1016/j.ncl.2018.04.003.
- [14] P.A. Northcott, G.W. Robinson, C.P. Kratz, D.J. Mabbott, S.L. Pomeroy, S.C. Clifford, S. Rutkowski, D.W. Ellison, D. Malkin, M.D. Taylor, A. Gajjar, and S.M. Pfister, Medulloblastoma, *Nature Reviews Disease Primers* 2019 5:1. **5** (2019) 1–20. doi:10.1038/s41572-019-0063-6.

- [15] N.I.S.M.S.J.H.P.H.C.N.A.B.D.P.Y.B.A.B.A.B.A. M.E. Paday Formenti, MRI features of medulloblastomas histologic and molecular subtypes, *European Society of Radiology*. (2019). doi:10.26044/ecr2019/C-2908.
- [16] B.A. Orr, Pathology, diagnostics, and classification of medulloblastoma, *Brain Pathology*. **30** (2020) 664. doi:10.1111/BPA.12837.
- [17] E. Franceschi, C. Giannini, J. Furtner, K.W. Pajtler, S. Asioli, R. Guzman, C. Seidel, L. Gatto, and P. Hau, Adult Medulloblastoma: Updates on Current Management and Future Perspectives, *Cancers (Basel)*. **14** (2022) 3708. doi:10.3390/CANCERS14153708.
- [18] A.G. Osborn, D.N. Louis, T.Y. Poussaint, L.L. Linscott, and K.L. Salzman, The 2021 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: What Neuroradiologists Need to Know, *American Journal of Neuroradiology*. **43** (2022) 928–937. doi:10.3174/AJNR.A7462.
- [19] L. Tamayo-Orrego, and F. Charron, Recent advances in SHH medulloblastoma progression: tumor suppressor mechanisms and the tumor microenvironment, *F1000Res*. **8** (2019). doi:10.12688/F1000RESEARCH.20013.1.
- [20] K. Juraschka, and M.D. Taylor, Medulloblastoma in the age of molecular subgroups: a review, *J Neurosurg Pediatr*. **24** (2019) 353–363. doi:10.3171/2019.5.PEDS18381.
- [21] R. Luque, M. Benavides, S. del Barco, L. Egaña, J. García-Gómez, M. Martínez-García, P. Pérez-Segura, E. Pineda, J.M. Sepúlveda, and M. Vieito, SEOM clinical guideline for management of adult medulloblastoma (2020), *Clinical & Translational Oncology*. **23** (2021) 940. doi:10.1007/S12094-021-02581-1.
- [22] A. Thomas, and G. Noël, Medulloblastoma: optimizing care with a multidisciplinary approach, *J Multidiscip Healthc*. **12** (2019) 335. doi:10.2147/JMDH.S167808.

- [23] J. Below, and J.M. Das, Vincristine, *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. (2022) 1–4. doi:10.1016/B978-008055232-3.62853-3.
- [24] K. Ribi, C. Relly, M.A. Landolt, F.D. Alber, E. Boltshauser, and M.A. Grotzer, Outcome of medulloblastoma in children: Long-term complications and quality of life, *Neuropediatrics*. **36** (2005) 357–365. doi:10.1055/S-2005-872880/ID/41.
- [25] H.J. Yoo, H. Kim, H.J. Park, D.S. Kim, Y.S. Ra, and H.Y. Shin, Neurocognitive Function and Health-Related Quality of Life in Pediatric Korean Survivors of Medulloblastoma, *J Korean Med Sci*. **31** (2016) 1726–1734. doi:10.3346/JKMS.2016.31.11.1726.
- [26] Q. Wang, and J. Liu, Medulloblastoma: Immune microenvironment and targeted nano-therapy, *OpenNano*. **6** (2022). doi:10.1016/J.ONANO.2022.100035.
- [27] N.F.H.N. van Bree, and M. Wilhelm, The Tumor Microenvironment of Medulloblastoma: An Intricate Multicellular Network with Therapeutic Potential, *Cancers (Basel)*. **14** (2022). doi:10.3390/CANCERS14205009.
- [28] J. Zhang, and T. Wang, Immune cell landscape and immunotherapy of medulloblastoma, *Pediatr Investig*. **5** (2021) 299. doi:10.1002/PED4.12261.
- [29] Y. Liu, L.W. Yuelling, Y. Wang, F. Du, R.E. Gordon, J.A. O'Brien, J.M.Y. Ng, S. Robins, E.H. Lee, H. Liu, T. Curran, and Z.J. Yang, Astrocytes promote medulloblastoma progression through hedgehog secretion, *Cancer Res*. **77** (2017) 6692. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-1463.
- [30] E. Gronseth, A. Gupta, C. Koceja, S. Kumar, R.G. Kutty, K. Rarick, L. Wang, and R. Ramchandran, Astrocytes influence medulloblastoma phenotypes and CD133 surface expression, *PLoS One*. **15** (2020). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0235852.

- [31] M. Yao, P.B. Ventura, Y. Jiang, F.J. Rodriguez, L. Wang, J.S.A. Perry, Y. Yang, K. Wahl, R.B. Crittenden, M.L. Bennett, L. Qi, C.C. Gong, X.N. Li, B.A. Barres, T.P. Bender, K.S. Ravichandran, K.A. Janes, C.G. Eberhart, and H. Zong, Astrocytic trans-Differentiation Completes a Multicellular Paracrine Feedback Loop Required for Medulloblastoma Tumor Growth, *Cell*. **180** (2020) 502-520.e19. doi:10.1016/J.CELL.2019.12.024/ATTACHMENT/04E4D733-08C1-44E6-A6D6-A936B189B3B8/MMC2.MP4.
- [32] S. Diao, C. Gu, H. Zhang, and C. Yu, Immune cell infiltration and cytokine secretion analysis reveal a non-inflammatory microenvironment of medulloblastoma, *Oncol Lett*. **20** (2020). doi:10.3892/OL.2020.12260.
- [33] M. Bockmayr, M. Mohme, F. Klauschen, B. Winkler, J. Budczies, S. Rutkowski, and U. Schüller, Subgroup-specific immune and stromal microenvironment in medulloblastoma, *Oncoimmunology*. **7** (2018). doi:10.1080/2162402X.2018.1462430/SUPPL\_FILE/KONI\_A\_1462430\_SM6238.ZIP.
- [34] S. Quintero-Fabián, R. Arreola, E. Becerril-Villanueva, J.C. Torres-Romero, V. Arana-Argáez, J. Lara-Riegos, M.A. Ramírez-Camacho, and M.E. Alvarez-Sánchez, Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer, *Front Oncol*. **9** (2019) 1370. doi:10.3389/FONC.2019.01370/BIBTEX.
- [35] Ö. Özen, B. Krebs, B. Hemmerlein, A. Pekrun, H. Kretschmar, and J. Herms, Expression of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Medulloblastomas and Their Prognostic Relevance, *Clinical Cancer Research*. **10** (2004) 4746–4753. doi:10.1158/1078-0432.CCR-0625-03.
- [36] E.C. Mateo, F.J.N. Motta, R.G.P. Queiroz, C.A. Scirileli, and L.G. Tone, Protein Expression of the Matrix Metalloproteinase (MMP-1, -2, -3, -9 and -14) in Ewing Family Tumors and Medulloblastoma of Pediatric Patients, *Pediatrics & Therapeutics*. **3** (2013) 1–5. doi:10.4172/2161-0665.S1-001.

- [37] F. Blaeschke, M.C. Paul, M.U. Schuhmann, A. Rabsteyn, C. Schroeder, N. Casadei, J. Matthes, C. Mohr, R. Lotfi, B. Wagner, T. Kaeuferle, J. Feucht, S. Willier, R. Handgretinger, S. Stevanović, P. Lang, and T. Feuchtinger, Low mutational load in pediatric medulloblastoma still translates into neoantigens as targets for specific T-cell immunotherapy, *Cytotherapy*. **21** (2019) 973–986. doi:10.1016/j.jcyt.2019.06.009.
- [38] S. Farkona, E.P. Diamandis, and I.M. Blasutig, Cancer immunotherapy: The beginning of the end of cancer?, *BMC Med*. **14** (2016) 1–18. doi:10.1186/S12916-016-0623-5/TABLES/3.
- [39] D.D. Chaplin, Overview of the Immune Response, *J Allergy Clin Immunol*. **125** (2010) S3. doi:10.1016/J.JACI.2009.12.980.
- [40] M.G. Netea, A. Schlitzer, K. Placek, L.A.B. Joosten, and J.L. Schultze, Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens, *Cell Host Microbe*. **25** (2019) 13–26. doi:10.1016/J.CHOM.2018.12.006.
- [41] T.F. Kabir, C.A. Kunos, J.L. Villano, and A. Chauhan, Immunotherapy for Medulloblastoma: Current Perspectives, *Immunotargets Ther*. **9** (2020) 57. doi:10.2147/ITT.S198162.
- [42] M.J. Voskamp, S. Li, K.R. van Daalen, S. Crnko, T. Ten Broeke, and N. Bovenschen, Immunotherapy in Medulloblastoma: Current State of Research, Challenges, and Future Perspectives, *Cancers (Basel)*. **13** (2021). doi:10.3390/CANCERS13215387.
- [43] R.C. Sterner, and R.M. Sterner, CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies, *Blood Cancer Journal 2021 11:4*. **11** (2021) 1–11. doi:10.1038/s41408-021-00459-7.
- [44] A. Nellan, C. Rota, R. Majzner, C.M. Lester-McCully, A.M. Griesinger, J.M. Mulcahy Levy, N.K. Foreman, K.E. Warren, and D.W. Lee, Durable regression of Medulloblastoma after regional and intravenous delivery of anti-HER2

- chimeric antigen receptor T cells, *J Immunother Cancer*. **6** (2018). doi:10.1186/S40425-018-0340-Z.
- [45] S. Adams, Toll-like receptor agonists in cancer therapy, *Immunotherapy*. **1** (2009) 949. doi:10.2217/IMT.09.70.
- [46] D.M. Abarca-Merlin, C. Maldonado-Bernal, L. Alvarez-Arellano, and S. Muthuraju, Toll-Like Receptors as Therapeutic Targets in Central Nervous System Tumors., *Biomed Res Int*. **2019** (2019) 5286358–5286358. doi:10.1155/2019/5286358.
- [47] X. Chen, Y. Zhang, and Y. Fu, The critical role of Toll-like receptor-mediated signaling in cancer immunotherapy, *Med Drug Discov*. **14** (2022) 100122. doi:10.1016/J.MEDIDD.2022.100122.
- [48] Z. Urban-Wojciuk, M.M. Khan, B.L. Oyler, R. Fåhraeus, N. Marek-Trzonkowska, A. Nita-Lazar, T.R. Hupp, and D.R. Goodlett, The Role of TLRs in Anti-cancer Immunity and Tumor Rejection, *Front Immunol*. **10** (2019) 2388. doi:10.3389/FIMMU.2019.02388.
- [49] S.B. Prasad, R. Kumar, S.B. Prasad, and R. Kumar, Role of Toll-Like Receptor (TLR)-Signaling in Cancer Progression and Treatment, *Cell Interaction - Molecular and Immunological Basis for Disease Management*. (2020). doi:10.5772/INTECHOPEN.94423.
- [50] M.K. Vidya, V.G. Kumar, V. Sejjan, M. Bagath, G. Krishnan, and R. Bhatta, Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals, <https://doi.org/10.1080/08830185.2017.1380200>. **37** (2017) 20–36. doi:10.1080/08830185.2017.1380200.
- [51] S.R. El-Zayat, H. Sibaii, and F.A. Mannaa, Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview, *Bulletin of the National Research Centre* **2019 43:1**. **43** (2019) 1–12. doi:10.1186/S42269-019-0227-2.



- [52] K.A. Fitzgerald, and J.C. Kagan, Toll-like Receptors and the Control of Immunity, *Cell*. **180** (2020) 1044–1066. doi:10.1016/J.CELL.2020.02.041.
- [53] H. Kumar, T. Kawai, and S. Akira, Toll-like receptors and innate immunity, *Biochem Biophys Res Commun*. **388** (2009) 621–625. doi:10.1016/J.BBRC.2009.08.062.
- [54] P. Behzadi, H.A. García-Perdomo, and T.M. Karpiński, Toll-Like Receptors: General Molecular and Structural Biology, *J Immunol Res*. **2021** (2021). doi:10.1155/2021/9914854.
- [55] D. De Nardo, Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation, *Cytokine*. **74** (2015) 181–189. doi:10.1016/J.CYTO.2015.02.025.
- [56] J.S. Roh, and D.H. Sohn, Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases, *Immune Netw*. **18** (2018). doi:10.4110/IN.2018.18.E27.
- [57] K. Wicherska-pawłowska, T. Wróbel, and J. Rybka, Toll-Like Receptors (TLRs), NOD-Like Receptors (NLRs), and RIG-I-Like Receptors (RLRs) in Innate Immunity. TLRs, NLRs, and RLRs Ligands as Immunotherapeutic Agents for Hematopoietic Diseases, *Int J Mol Sci*. **22** (2021). doi:10.3390/IJMS222413397.
- [58] A.S. Sameer, and S. Nissar, Toll-Like Receptors (TLRs): Structure, Functions, Signaling, and Role of Their Polymorphisms in Colorectal Cancer Susceptibility, *Biomed Res Int*. **2021** (2021). doi:10.1155/2021/1157023.
- [59] T. Kawasaki, and T. Kawai, Toll-like receptor signaling pathways, *Front Immunol*. **5** (2014) 461. doi:10.3389/FIMMU.2014.00461/BIBTEX.
- [60] H. Kumar, T. Kawai, and S. Akira, Toll-like receptors and innate immunity, *Biochem Biophys Res Commun*. **388** (2009) 621–625. doi:10.1016/J.BBRC.2009.08.062.

- [61] J. Aluri, M.A. Cooper, and L.G. Schuettpelez, Toll-Like Receptor Signaling in the Establishment and Function of the Immune System, *Cells* 2021, Vol. 10, Page 1374. **10** (2021) 1374. doi:10.3390/CELLS10061374.
- [62] X. Li, S. Jiang, and R.I. Tapping, Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival, *Cytokine*. **49** (2010) 1. doi:10.1016/J.CYTO.2009.08.010.
- [63] T. Liu, L. Zhang, D. Joo, and S.C. Sun, NF- $\kappa$ B signaling in inflammation, *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2017 2:1. **2** (2017) 1–9. doi:10.1038/sigtrans.2017.23.
- [64] V. Atsaves, V. Leventaki, G.Z. Rassidakis, and F.X. Claret, AP-1 Transcription Factors as Regulators of Immune Responses in Cancer, *Cancers* 2019, Vol. 11, Page 1037. **11** (2019) 1037. doi:10.3390/CANCERS11071037.
- [65] U.A. Hasan, C. Caux, I. Perrot, A.C. Doffin, C. Menetrier-Caux, G. Trinchieri, M. Tommasino, and J. Vlach, Cell proliferation and survival induced by Toll-like receptors is antagonized by type I IFNs, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104** (2007) 8047–8052. doi:10.1073/PNAS.0700664104/SUPPL\_FILE/00664FIG9.JPG.
- [66] L. Guo, T. Fang, Y. Jiang, and D. Liu, IRF7 is a Prognostic Biomarker and Associated with Immune Infiltration in Stomach Adenocarcinoma, *Int J Gen Med*. **14** (2021) 9887. doi:10.2147/IJGM.S342607.
- [67] Z. Li, M. Geng, X. Ye, Y. Ji, Y. Li, X. Zhang, and W. Xu, IRF7 inhibits the Warburg effect via transcriptional suppression of PKM2 in osteosarcoma, *Int J Biol Sci*. **18** (2022) 30. doi:10.7150/IJBS.65255.
- [68] G. Hu, and B.J. Barnes, IRF-5 is a mediator of the death receptor-induced apoptotic signaling pathway, *Journal of Biological Chemistry*. **284** (2009) 2767–2777. doi:10.1074/jbc.M804744200.
- [69] Y. Zhang, H. Yang, P.A. Barnie, P. Yang, Z. Su, J. Chen, Z. Jiao, L. Lu, S. Wang, and H. Xu, The Expression of Toll-like Receptor 8 and Its Relationship

with VEGF and Bcl-2 in Cervical Cancer, *Int J Med Sci.* **11** (2014) 608. doi:10.7150/IJMS.8428.

- [70] T. Yin, S. He, and Y. Wang, Toll-like receptor 7/8 agonist, R848, exhibits antitumoral effects in a breast cancer model, *Mol Med Rep.* **12** (2015) 3515–3520. doi:10.3892/MMR.2015.3885/HTML.
- [71] T. Grimmig, N. Matthes, K. Hoeland, S. Tripathi, A. Chandraker, M. Grimm, R. Moench, E.M. Moll, H. Friess, I. Tsaour, R.A. Blaheta, C.T. Germer, A.M. Waaga-Gasser, and M. Gasser, TLR7 and TLR8 expression increases tumor cell proliferation and promotes chemoresistance in human pancreatic cancer, *Int J Oncol.* **47** (2015) 857–866. doi:10.3892/IJO.2015.3069/HTML.
- [72] A. Stathopoulos, C. Pretto, L. Devillers, D. Pierre, F.M. Hofman, C. Kruse, M.R. Jodus, T.C. Chen, and V.E.J.C. Schijns, Development of immune memory to glial brain tumors after tumor regression induced by immunotherapeutic Toll-like receptor 7/8 activation, *Oncoimmunology.* **1** (2012) 298. doi:10.4161/ONCI.19068.
- [73] A. Benbenishty, M. Gadrich, A. Cottarelli, A. Lubart, D. Kain, M. Amer, L. Shaashua, A. Glasner, N. Erez, D. Agalliu, L. Mayo, S. Ben-Eliyahu, and P. Blinder, Prophylactic TLR9 stimulation reduces brain metastasis through microglia activation, *PLoS Biol.* **17** (2019). doi:10.1371/JOURNAL.PBIO.2006859.
- [74] D. Maslinska, M. Laure-Kamionowska, and S. Maslinski, Original article<Br>Toll-like receptors as an innate immunity bridge to neuroinflammation in medulloblastoma, *Folia Neuropathol.* **50** (2012) 375–381. doi:10.5114/FN.2012.32367.
- [75] L. Alvarez-Arellano, P. Eguía-Aguilar, P. Piña-Sánchez, N. González-García, A. Palma-Guzman, M. Perezpeña-Diazconti, and C. Maldonado-Bernal, High expression of Toll-like receptor 7 is a survival factor in pediatric

- medulloblastoma, *Child's Nervous System*. **37** (2021) 3743–3752. doi:10.1007/S00381-021-05347-W/METRICS.
- [76] J. Charan, and N. Kantharia, How to calculate sample size in animal studies?, *J Pharmacol Pharmacother*. **4** (2013) 303. doi:10.4103/0976-500X.119726.
- [77] S. Uxa, P. Castillo-Binder, R. Kohler, K. Stangner, G.A. Müller, and K. Engeland, Ki-67 gene expression, *Cell Death & Differentiation* **2021 28:12**. **28** (2021) 3357–3370. doi:10.1038/s41418-021-00823-x.
- [78] X. Sun, and P.D. Kaufman, Ki-67: more than a proliferation marker, *Chromosoma*. **127** (2018) 175. doi:10.1007/S00412-018-0659-8.
- [79] Z. Wan, M.A. Floryan, M.F. Coughlin, S. Zhang, A.X. Zhong, S.E. Shelton, X. Wang, C. Xu, D.A. Barbie, R.D. Kamm, Z. Wan, M.F. Coughlin, S. Zhang, A.X. Zhong, S.E. Shelton, X. Wang, R.D. Kamm, D.A. Barbie, M.A. Floryan, and C. Xu, New Strategy for Promoting Vascularization in Tumor Spheroids in a Microfluidic Assay, *Adv Healthc Mater*. (2022) 2201784. doi:10.1002/ADHM.202201784.
- [80] P. Figueiredo, A. Lepland, P. Scodeller, F. Fontana, G. Torrieri, M. Tiboni, M.A. Shahbazi, L. Casettari, M.A. Kostianen, J. Hirvonen, T. Teesalu, and H.A. Santos, Peptide-guided resiquimod-loaded lignin nanoparticles convert tumor-associated macrophages from M2 to M1 phenotype for enhanced chemotherapy, *Acta Biomater*. **133** (2021) 231–243. doi:10.1016/J.ACTBIO.2020.09.038.
- [81] V. Turco, K. Pfeleiderer, J. Hunger, N.K. Horvat, K. Karimian-Jazi, K. Schregel, M. Fischer, G. Brugnara, K. Jähne, V. Sturm, Y. Streibel, D. Nguyen, S. Altamura, D.A. Agardy, S.S. Soni, A. Alsasa, T. Bunse, M. Schlesner, M.U. Muckenthaler, R. Weissleder, W. Wick, S. Heiland, P. Vollmuth, M. Bendszus, C.B. Rodell, M.O. Breckwoldt, and M. Platten, T cell-independent eradication of experimental glioma by intravenous TLR7/8-agonist-loaded nanoparticles, *Nat Commun*. **14** (2023). doi:10.1038/S41467-023-36321-6.

- [82] D. Ciencias Farmacéuticas, H. Jung Cook, G. de Anda Jáuregui, K. Rubio Carrasco, L. Mayet Cruz, and D. Helgi Jung Cook, Comparación de perfiles de disolución: Impacto de los criterios de diferentes agencias regulatorias en el cálculo de  $f_2$ , *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. **43** (2012) 67–71. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-01952012000300007&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952012000300007&lng=es&nrm=iso&tlng=es) (accessed July 3, 2023).
- [83] J. Cherfils-Vicini, S. Platonova, M. Gillard, L. Laurans, P. Validire, R. Caliandro, P. Magdeleinat, F. Mami-Chouaib, M.C. Dieu-Nosjean, W.H. Fridman, D. Damotte, C. Sautès-Fridman, and I. Cremer, Triggering of TLR7 and TLR8 expressed by human lung cancer cells induces cell survival and chemoresistance, *J Clin Invest*. **120** (2010) 1285–1297. doi:10.1172/JCI36551.
- [84] Y. Jing, M. Jia, J. Zhuang, D. Han, C. Zhou, and J. Yan, TLR9 Exerts an Oncogenic Role in Promoting Osteosarcoma Progression Depending on the Regulation of NF- $\kappa$ B Signaling Pathway, *Biol Pharm Bull*. **45** (2022) 1733–1742. doi:10.1248/BPB.B22-00295.
- [85] Y. Cai, J. Huang, H. Xing, B. Li, L. Li, X. Wang, D. Peng, and J. Chen, Contribution of FPR and TLR9 to hypoxia-induced chemoresistance of ovarian cancer cells, *Onco Targets Ther*. **12** (2018) 291–301. doi:10.2147/OTT.S190118.
- [86] J. Tanaka, K. Sugimoto, K. Shiraki, M. Tameda, S. Kusagawa, K. Nojiri, T. Beppu, K. Yoneda, N. Yamamoto, K. Uchida, T. Kojima, and Y. Takei, Functional cell surface expression of Toll-like receptor 9 promotes cell proliferation and survival in human hepatocellular carcinomas, *Int J Oncol*. **37** (2010) 805–814. doi:10.3892/IJO\_00000730.
- [87] M. Shibuya, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies, *Genes Cancer*. **2** (2011) 1097. doi:10.1177/1947601911423031.

- [88] J.C. Chen, Y.W. Chang, C.C. Hong, Y.H. Yu, and J.L. Su, The Role of the VEGF-C/VEGFRs Axis in Tumor Progression and Therapy, *Int J Mol Sci.* **14** (2013) 88. doi:10.3390/IJMS14010088.
- [89] C. Tacconi, F. Ungaro, C. Correale, V. Arena, L. Massimino, M. Detmar, A. Spinelli, M. Carvello, M. Mazzone, A.I. Oliveira, F. Rubbino, V. Garlatti, S. Spano, E. Lugli, F.S. Colombo, A. Malesci, L. Peyrin-Biroulet, S. Vetrano, S. Danese, and S. D'Alessio, Activation of the VEGFC/VEGFR3 pathway induces tumor immune escape in colorectal cancer, *Cancer Res.* **79** (2019) 4196–4210. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-3657/653622/AM/ACTIVATION-OF-THE-VEGFC-VEGFR3-PATHWAY-INDUCES.
- [90] M. Penco-Campillo, Y. Comoglio, Á.J. Feliz Morel, R. Hanna, J. Durivault, M. Leloire, B. Mejias, M. Pagnuzzi, A. Morot, F. Burel-Vandenbos, M. Selby, D. Williamson, S.C. Clifford, A. Claren, J. Doyen, V. Picco, S. Martial, and G. Pagès, VEGFC negatively regulates the growth and aggressiveness of medulloblastoma cells, *Communications Biology* 2020 3:1. **3** (2020) 1–14. doi:10.1038/s42003-020-01306-4.
- [91] E. Song, T. Mao, H. Dong, L.S.B. Boisserand, S. Antila, M. Bosenberg, K. Alitalo, J.L. Thomas, and A. Iwasaki, VEGF-C-driven lymphatic drainage enables brain tumor immunosurveillance, *Nature.* **577** (2020) 689. doi:10.1038/S41586-019-1912-X.
- [92] P. Godwin, A.M. Baird, S. Heavey, M.P. Barr, K.J. O'Byrne, and K. Gately, Targeting Nuclear Factor-Kappa B to Overcome Resistance to Chemotherapy, *Front Oncol.* **3** (2013). doi:10.3389/FONC.2013.00120.
- [93] B. Mansoori, A. Mohammadi, S. Davudian, S. Shirjang, and B. Baradaran, The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review, *Adv Pharm Bull.* **7** (2017) 339. doi:10.15171/APB.2017.041.
- [94] M. Körber, A. Staribacher, I. Ratzenböck, G. Steger, and R. Mader, NFκB associate pathways in progression of chemoresistance to 5-Fluorouracil in an

In Vitro model of colonic carcinoma, *Anticancer Research* . **36** (2016) 1631–1640.

- [95] MicroRNAs and cancer: Key paradigms in molecular therapy (Review), (n.d.). <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2017.7638> (accessed October 30, 2023).
- [96] D.S. Jiang, Y.W. Wang, J. Jiang, S.M. Li, S.Z. Liang, and H.Y. Fang, MicroRNA-26a involved in Toll-like receptor 9-mediated lung cancer growth and migration, *Int J Mol Med*. **34** (2014) 307–312. doi:10.3892/IJMM.2014.1764/HTML.
- [97] H.C. Zheng, The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers, *Oncotarget*. **8** (2017) 59950. doi:10.18632/ONCOTARGET.19048.
- [98] Y. Pu, J. Wang, and S. Wang, Role of autophagy in drug resistance and regulation of osteosarcoma (Review), *Mol Clin Oncol*. **16** (2022). doi:10.3892/MCO.2022.2505.
- [99] H.J. Lee, S.J. Kang, Y. Woo, T.W. Hahn, H.J. Ko, and Y.J. Jung, TLR7 Stimulation With Imiquimod Induces Selective Autophagy and Controls Mycobacterium tuberculosis Growth in Mouse Macrophages, *Front Microbiol*. **11** (2020) 521537. doi:10.3389/FMICB.2020.01684/BIBTEX.
- [100] G.R. Campbell, and S.A. Spector, Toll-Like Receptor 8 Ligands Activate a Vitamin D Mediated Autophagic Response that Inhibits Human Immunodeficiency Virus Type 1, *PLoS Pathog*. **8** (2012) e1003017. doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1003017.
- [101] J.S. Lim, H.S. Kim, K.C.T. Nguyen, and K.A. Cho, The role of TLR9 in stress-dependent autophagy formation, *Biochem Biophys Res Commun*. **481** (2016) 219–226. doi:10.1016/J.BBRC.2016.10.105.

- [102] R. Paul, H. Bharambe, and N.V. Shirsat, Autophagy inhibition impairs the invasion potential of medulloblastoma cells, *Mol Biol Rep.* **47** (2020) 5673–5680. doi:10.1007/S11033-020-05603-3/METRICS.
- [103] N. Gammoh, J. Fraser, C. Puente, H.M. Syred, H. Kang, T. Ozawa, D. Lam, J.C. Acosta, A.J. Finch, E. Holland, and X. Jiang, Suppression of autophagy impedes glioblastoma development and induces senescence, *Autophagy.* **12** (2016) 1431. doi:10.1080/15548627.2016.1190053.
- [104] M. Rouanet, N. Hanoun, Hubert Lulka, C. Ferreira, P. Garcin, M. Sramek, G. Jacquemin, A. Coste, D. Pagan, C. Valle, E. Sarot, V. Pancaldi, F. Lopez, L. Buscail, and P. Cordelier, The antitumoral activity of TLR7 ligands is corrupted by the microenvironment of pancreatic tumors, *Molecular Therapy.* **30** (2022) 1553. doi:10.1016/J.YMTHE.2022.01.018.
- [105] M. Dajon, K. Iribarren, F. Petitprez, S. Marmier, A. Lupo, M. Gillard, H. Ouakrim, N. Victor, D.B. Vincenzo, P.E. Joubert, O. Kepp, G. Kroemer, M. Alifano, D. Damotte, and I. Cremer, Toll like receptor 7 expressed by malignant cells promotes tumor progression and metastasis through the recruitment of myeloid derived suppressor cells, *Oncoimmunology.* **8** (2019). doi:10.1080/2162402X.2018.1505174.
- [106] C. Gao, A. Kozłowska, S. Nechaev, H. Li, Q. Zhang, D.M.S. Hossain, C.M. Kowolik, P. Chu, P. Swiderski, D.J. Diamond, S.K. Pal, A. Raubitschek, and M. Kortylewski, TLR9 signaling in the tumor microenvironment initiates cancer recurrence after radiation therapy, *Cancer Res.* **73** (2013) 7211. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1314.
- [107] C.M. Neophytou, C. Pierides, M.I. Christodoulou, P. Costeas, T.C. Kyriakou, and P. Papageorgis, The Role of Tumor-Associated Myeloid Cells in Modulating Cancer Therapy, *Front Oncol.* **10** (2020) 899. doi:10.3389/FONC.2020.00899.