



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**ACTIVACIÓN DE RECEPTORES TIPO TOLL (TLRs) Y SU
PARTICIPACIÓN EN LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS
DE MEDULOBLASTOMA**

T E S I S

Que para obtener el título de
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGA

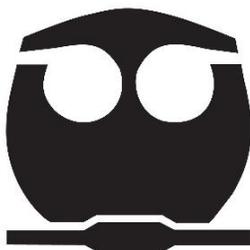
P R E S E N T A

SHIRLEY RODRÍGUEZ CHÁVEZ

ASESOR DE TESIS

DRA. MARÍA DE LOURDES ÁLVAREZ ARELLANO

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX. 2020





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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

VOCAL: DRA. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ

SECRETARIO: DRA. MARÍA DE LOURDES ÁLVAREZ ARELLANO

1er.SUPLENTE: DR. OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA

2do SUPLENTE: DRA. MARÍA DEL CONSUELO PLATA RAMOS

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN NEUROCIENCIAS

4TO PISO EDIFICIO ARTURO MUNDET

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO "DR. FEDERICO GÓMEZ"

ASESOR DEL TEMA:

DRA. ÁLVAREZ ARELLANO MARÍA DE LOURDES.

SUSTENTANTE:

RODRÍGUEZ CHÁVEZ SHIRLEY

Agradecimientos Institucionales

A la Máxima casa de Estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México y mi honorable Facultad de Química por todas las experiencias logradas durante mi formación que me han permitido crecer.

A la doctora Lourdes Álvarez Arellano asesora de este trabajo, le agradezco todas sus enseñanzas, sugerencias, consejos y paciencia. Aprecio la confianza depositada en mí durante este tiempo.

Al doctor Pablo Enrique Domínguez López por su contribución, asesoría, enseñanzas, apoyo y hospitalidad en su laboratorio.

Al doctor Juan Carlos Corona Castillo por facilitarme las instalaciones del laboratorio de Neurociencias del hospital Infantil de México a lo largo de mi estancia.

A los miembros de mi comité tutor, el doctor Jesús Fernando Montiel Aguirre, la doctora Perla Deyanira Maldonado Jiménez, la doctora María de Lourdes Álvarez Arellano, el doctor Octavio Castro Escamilla y la doctora María del Consuelo Plata Ramos por su tiempo, su valiosa revisión y recomendaciones propuestas durante la elaboración de este proyecto.

Agradecimientos personales

A Dios por permitirme cumplir un sueño tan grande, gracias porque tengo la certeza de que sin Él no hubiera podido concluir con esta etapa. Por poner las cosas en su debido momento, ni antes ni después.

A mi mamá Xóchitl Chávez, porque quien soy es producto de tus enseñanzas, de cada palabra de aliento y de la educación que en mí formaste. No hay forma de agradecer el que siempre estuviste ahí, la confianza que depositaste en mí para ver este sueño realizado y la compañía que me brindaste en cada paso. Porque tus ojos veían en mí más de lo que yo misma podía, este logro es de ambas.

A mi papá Agustín Rodríguez, pues nunca me hizo falta nada. Tu apoyo incondicional ha estado siempre presente y me has enseñado a no darme por vencida nunca, que cada cosa que me proponga con esfuerzo y dedicación puedo lograrla. Sé que sin tu esfuerzo no sería quien soy ahora, ni quien seré mañana. Porque eres un ejemplo de perseverancia y porque sin importar el cansancio físico, lo diste todo para que hoy yo pueda decir, lo logramos.

A mi hermano Ricardo por estar a mi lado y retarme cada día a ser mejor. Porque tengo la oportunidad de tener un compañero en el que puedo confiar y que confía en mí a pesar de las circunstancias.

A mis tíos Francisco y Arcelia, porque nunca me han dejado sola. Su compañía y apoyo me dieron la fuerza para concluir con este sueño. Gracias por cada oración y por cada palabra de aliento, por recibirme con los brazos abiertos y por cuidar tanto de mí, por escucharme siempre y quererme tanto.

A mi tío Jorge, por estar al pendiente siempre. Porque creíste en mí aún en días donde yo misma no podía hacerlo. Gracias por cada consejo y sabias palabras, no has dejado de seguir cada paso que doy y siempre hay en ti un apoyo incondicional.

A mi amiga y compañera Nafer por alentarme, animarme y exigirme a dar mi mayor esfuerzo. Porque pasamos por este proceso juntas, lloramos juntas y reímos juntas, gracias por estar conmigo. Con mi mano puedo contar a las personas incondicionales en mi vida y tú eres una de ellas.

Al latoso más latoso de la historia. Porque sin que lo supieras, Dios mostró su amor para conmigo enviándote a mi vida. Gracias por estar ahí siempre, incluso en los peores momentos. Por brindarme tu mano cuando la necesito y por ser parte de cada locura que se mete en mi cabeza.

“Rodéate de los soñadores, de los hacedores, de los creyentes y de los pensadores, pero, sobre todo, rodéate de aquellos que ven la grandeza dentro de ti, aun cuando tú no puedas verla”. **De corazón ¡Muchas gracias!**

ÍNDICE

	Página
1. RESUMEN	8
2. INTRODUCCIÓN	10
2.1 Meduloblastoma	10
2.1.1 Clasificación	11
2.2 Microambiente tumoral	12
2.3 Respuesta inmunológica	13
2.4 Receptores tipo Toll (TLRs)	14
2.4.1 Vía de señalización	16
2.5 Migración y proliferación celular	19
3. ANTECEDENTES	21
4. JUSTIFICACIÓN	22
5. HIPÓTESIS	23
6. OBJETIVO GENERAL	24
7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
8. MATERIAL Y MÉTODOS	25
8.1 Cultivo celular	25
8.2 Ensayo de migración	25
8.3 Extracción de proteínas	26
8.4 Electroforesis en gel de acrilamida	27
8.5 Western blot	27
8.6 Análisis estadístico	28

9. RESULTADOS	29
9.1 La migración de las células de meduloblastoma es afectada por la activación de los TLRs	29
9.2 Los niveles NF- κ B disminuyen en la estimulación de los TLRs en células de meduloblastoma	32
10. DISCUSIÓN	40
11. CONCLUSIONES	43
12. PERSPECTIVAS	44
13. BIBLIOGRAFÍA	45

1. RESUMEN

El meduloblastoma comprende un grupo biológicamente heterogéneo de tumores embrionarios del cerebelo y es uno de los tumores cerebrales infantiles malignos más frecuentes principalmente en niños cuyo pico de edad es de 6 a 8 años. A pesar de que en la actualidad existen diversos tratamientos para su erradicación y disminución, que incluyen la resección quirúrgica, la quimioterapia y la radioterapia; la toxicidad relacionada con su tratamiento a menudo tiene un impacto importante en la calidad de vida del paciente. Además, el meduloblastoma es propenso a difundir por metástasis, lo cual representa una problemática más al estudio y tratamiento de la enfermedad. Como parte de su estudio recientemente ha tomado gran relevancia la heterogeneidad patológica, genética y molecular, así como la respuesta inmune como factor decisivo en el establecimiento y desarrollo de los tumores sólidos. Se sabe que las células tumorales expresan receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) y en el caso del meduloblastoma, existe un antecedente de la expresión de los receptores tipo toll (TLRs) en biopsias de pacientes, sin embargo, se desconoce su participación en la respuesta tumoral. La señalización de TLRs puede inducir efectos anti o pro tumorales que dependen del tipo de cáncer en el que se expresan. Se ha documentado que la estimulación de TLRs puede tener efectos antitumorales a través de las células inmunes o directamente sobre las células tumorales reduciendo el crecimiento del tumor por bloqueo de la angiogénesis y metástasis. No obstante, los TLRs presentes en las células tumorales también activan factores de transcripción que participan en la progresión y agresividad del tumor favoreciendo su desarrollo; por ello, conocer el efecto de la activación de los TLRs expresados en meduloblastoma es de suma importancia para la comprensión de la biología del tumor, ya que su entendimiento puede representar el desarrollo de terapias dirigidas utilizando agentes inmunomoduladores que disminuyan el riesgo de los efectos secundarios. En el presente trabajo se buscó determinar el efecto de diversos agonistas de TLR7, TLR8 y TLR9 (R848, Imiquimod, oligonucleótidos sintéticos tipo B (ODNs B), respectivamente) en la capacidad de migración de las células de meduloblastoma, así como conocer la vía de señalización involucrada en la activación de los TLRs que promueve la migración. Los resultados obtenidos mostraron que la migración de las células de meduloblastoma es afectada por la estimulación de los TLRs. La activación de TLR7, TLR8 y TLR9 por imiquimod, R848 y ODNs B, respectivamente fue eficaz en suprimir la migración de las células de meduloblastoma. Por otro lado, se observó que la estimulación de TLR9 induce una disminución en la expresión del factor NF- κ B en las células de meduloblastoma.

Estudios complementarios son necesarios para determinar la participación de NF- κ B en la migración de las células de meduloblastoma mediada por TLRs, además de la participación de otros receptores involucrados en la activación del

factor NF- κ B, así como la importancia de otros factores de transcripción como AP-1, aspectos que serán importantes en el entendimiento de los mecanismos de migración celular y que pueden significar una herramienta importante en la búsqueda de alternativas o adyuvantes del tratamiento actual.

En conclusión, en este trabajo se mostró que la activación de TLR7, TLR8 y TLR9 induce una respuesta caracterizada por la supresión de la migración de las células de meduloblastoma, además de disminuir la activación de NF- κ B.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Meduloblastoma

El meduloblastoma es un tumor embrionario neuroepitelial que se encuentra entre los tumores malignos más comunes en la edad infantil. La edad de diagnóstico más frecuente va de los 6 a los 8 años, sin embargo puede ocurrir durante el primer año de vida o en la edad adulta para algunos individuos¹.

El meduloblastoma se encuentra ubicado en el cerebelo y es originado por células progenitoras neuronales de la capa granular externa y de la matriz ventricular subependimaria². Fue descrito por primera vez en 1925 por Bailey y Cushing³. Inicialmente incluido como parte de los gliomas, el meduloblastoma se identificó como una serie distinta de tumor, gracias a estudios de expresión de genes, y se confirmó que era molecularmente distinto de otros tumores cerebrales. Posee una amplia heterogeneidad y su etiología aún es desconocida; sin embargo, los factores hereditarios provocan una predisposición genética asociada a otras enfermedades.

Las manifestaciones clínicas iniciales no son específicas, son intermitentes y sutiles como dolores de cabeza, fatiga, náuseas, ataxia, dificultad con la escritura a mano y estrabismo, debido al aumento en la presión intracraneal. Los síntomas pueden empeorar rápidamente a causa del crecimiento acelerado del tumor. El diagnóstico se realiza por histopatología, resonancia magnética cerebral, análisis molecular, y citología de líquido cefalorraquídeo, entre otros. En ocasiones poco frecuentes se diagnostica en adultos, y es más común en hombres que en mujeres¹.

El meduloblastoma es considerado la segunda causa de muerte por cáncer en menores de 15 años. Una vez extirpado el tumor, la supervivencia en pacientes menores a tres años es del 70-85% si se trata de meduloblastoma no metastásico; mientras que en el metastásico, la supervivencia global es menor al 70% considerándose de alto riesgo.

La resección quirúrgica y la terapia adyuvante como la radioterapia craneoespinal y la quimioterapia, se han convertido en los tratamientos estándar para su erradicación, produciendo una mayor supervivencia (aproximadamente del 80%). El meduloblastoma posee altos índices de recidiva tumoral, por lo que cirugías secundarias son comunes, lo cual aumenta el riesgo de mortalidad. En el caso de la radiación, se lleva a cabo en todo el eje craneoespinal, obteniéndose como efectos adversos trastornos del crecimiento, disfunción neuroendocrina, entre otros. La quimioterapia que se utiliza actualmente incluye a la vincristina y el cisplatino; sin embargo, el tratamiento posee un alto índice de toxicidad, además de

estar asociado a efectos adversos a menor edad del paciente, siendo debilitante para menores de 3 años.

El tratamiento de los lactantes y niños muy pequeños es particularmente difícil, debido a que la irradiación del cerebro en desarrollo conduce a un deterioro neurocognitivo masivo⁴. En contraste con los niños mayores, las tasas de supervivencia para niños menores de 3 años tratados con cirugía, quimioterapia y radioterapia no superan el 25-45%⁵.

2.1.1 Clasificación

Existe una amplia heterogeneidad de meduloblastomas, por ello para una mejor comprensión y caracterización se han clasificado principalmente por factores clínicos y por sus características histológicas y moleculares.

El meduloblastoma posee una amplia gama de manifestaciones clínicas, clasificadas en dos factores de riesgo; el riesgo estándar y el riesgo alto.

- a) Riesgo estándar: pacientes con edades entre 3 a 5 años hasta 21 años en el diagnóstico, con resección máxima del tumor, sin metástasis macroscópicas, e histológicamente desmoplásicos.
- b) Riesgo alto: pacientes neonatales, y menores de 3 años, con presencia de metástasis, clásico, e histológicamente anaplásico.

Por otro lado, la organización mundial de la salud, ha definido 4 subtipos de meduloblastoma basados en sus características histológicas: 1) el meduloblastoma clásico, que se compone de capas de células pequeñas⁶, 2) el meduloblastoma desmoplásico nodular caracterizado por células con abundante estroma y apariencia nodular⁵, 3) el meduloblastoma con nodularidad extensa (MBEN) de arquitectura lobular, y 4) el meduloblastoma anaplásico de células grandes (LCA) formado por células con núcleos grandes y redondos⁷.

Diversos estudios han sugerido, eventos genéticos somáticos y diferencias en el transcriptoma, sugiriendo la existencia de 4 subgrupos moleculares de meduloblastoma; el Wnt que es el más conocido actualmente y poseen un buen pronóstico¹, el subgrupo SHH que es un tumor característico dominante en pacientes menores a 3 años, el subgrupo 3 que posee una alta incidencia de metástasis y es considerado el subgrupo más agresivo¹ y por último el subgrupo 4 que posee una supervivencia intermedia⁷. Los 4 subgrupos poseen demografía, histología, número de copias de DNA y resultados clínicos distintos entre ellos, añadiendo significativamente un aumento en la predicción de resultados al momento del diagnóstico.

2.2 Microambiente tumoral

Inicialmente las investigaciones generadas para la comprensión del cáncer estaban enfocadas directamente en la célula maligna, intentando entender los genes que provocaban su activación, regulación y expresión de diferentes funciones que provocaron su transformación a células aberrantes. Sin embargo, el microambiente tumoral tiene un papel de gran importancia para el desarrollo y mantenimiento de la enfermedad, con la premisa de que las células cancerosas no manifiestan la enfermedad por sí solas, sino, que reclutan a otras células de su entorno, teniendo mayor impacto en el crecimiento, progresión del tumor, y resistencia frente a la terapia⁸.

El microambiente tumoral se encuentra formado por las células cancerosas, las células del sistema inmune (linfocitos T y B, neutrófilos, macrófagos, mastocitos, células dendríticas, y células asesinas naturales [NK]) y el estroma circundante (fibroblastos, células endoteliales vasculares, y proteínas como el factor de crecimiento epidérmico [EGF], el factor de crecimiento transformante β [TGF- β], el factor de necrosis tumoral α [TNF- α], varias interleucinas [IL], y quimiocinas)⁹.

Las diversas células del estroma contribuyen como estructura de soporte para el crecimiento tumoral y también mantienen a la célula tumoral en constante replicación y contribuyen en la activación de la señalización proliferativa, invasión, resistencia a la muerte celular, metástasis e inducen la angiogénesis¹⁰.

Algunas de las células infiltradas pueden expresar diversas clases de enzimas proteolíticas para escindir y modificar la estructura de la matriz extracelular que contribuye como soporte para el crecimiento tumoral^{9,11}. Además, la gran mayoría de los tumores contienen leucocitos infiltrados, encargados de aportar mediadores de crecimiento para estimular la proliferación de las células cancerosas.

El conocer la identidad de los tipos celulares, así como las señales que desencadenan, permite comprender el mecanismo microambiental y el desarrollo de terapias alternativas para combatir la enfermedad. La comunicación entre los tipos celulares es lo que determina y controla el crecimiento del tumor; la expresión de receptores, moléculas de coestimulación, y diversos mediadores inflamatorios determinan la dirección en la que se inclina el avance en la enfermedad.

2.3 Respuesta inmunológica

La activación de las células del sistema inmune se basa en el reconocimiento de moléculas asociadas a microorganismos (MAMPs) o asociados a daño (DAMPs), dicho reconocimiento se lleva a cabo por medio de receptores codificados en la línea germinal, conocidos como receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), los cuales pueden ser expresados en la superficie celular, el citoplasma, en compartimentos intracelulares o secretados al medio extracelular. En esta familia de PRRs se encuentran los NLRs (receptores NOD), receptores de manosa, la lectina unidora de manosa (MBL), los receptores tipo toll (TLRs), entre otros¹². Una vez que se ven activados estos receptores, se estimulan funciones efectoras que promueven el inicio de la transcripción de genes que codifican para proteínas tales como el complemento, citocinas, quimiocinas, factores de opsonización, moléculas de adhesión, proliferación, muerte celular, etc¹³.

2.4 Receptores tipo Toll (TLRs)

Los receptores tipo Toll son proteínas transmembranales de tipo I, caracterizados por poseer un dominio extracelular con regiones repetitivas ricas en leucina (LRR) donde se lleva a cabo el reconocimiento de los ligandos. Además, poseen un dominio intracelular similar al de los receptores de interleucina (TIR) cuya función es mediar las interacciones entre los TLRs y los componentes de transducción de señales¹⁴. Tienen un papel de suma importancia en la defensa, ya que se encargan de mediar el reconocimiento de MAMPs (incluyendo lípidos, lipoproteínas, proteínas y ácidos nucleicos derivados de microbios, bacterias, virus, hongos, etc) y DAMPs (fibronectina, fibrinógeno, proteínas de choque térmico, F-actina, histonas, ARN, etc)¹⁵ (**Tabla 1**).

Tabla 1. Ligandos de los TLRs.

Receptor	Ligandos	Referencias
TLR1	Lipoproteínas	19
TLR2	Lipoproteínas, peptidoglicano, ácido lipoteicoico, proteínas de choque térmico	20
TLR3	dsRNA viral	21
TLR4	Lipopolisacáridos, derivados de lípido A, ácido hialurónico	22
TLR5	Flagelina	23
TLR6	Lipoproteínas de diacilo, ácido lipoteicoico, zymosan, diacilados sintéticos	19
TLR7	ssRNA viral y bacteriano, compuestos de tiazoloquinolinas e imidazoquinolinas (R848, imiquimod)	24
TLR8	ssRNA viral y bacteriano, compuestos de imidazoquinolina y tiazoloquinolina (R848, imiquimod)	25
TLR9	DNA viral y bacteriano, complejos cromatina IgG	26
TLR10	Desconocido	27
TLR11	Profilina, cromatina IgG	28
TLR12	Profilina	28
TLR13	RNA ribosomal bacteriano	29

Se han identificado 10 TLRs funcionales en el humano y 13 en ratones y se ha demostrado que cada uno posee una función distinta en términos de la respuesta inmune¹⁴.

El reconocimiento de los MAMPs por los TLRs ocurre en diversos compartimentos celulares como son la membrana citoplásmica, los endosomas, los lisosomas y endolisosomas. Estudios han demostrado que los TLRs reclutan selectivamente moléculas adaptadoras distintas, y así proporcionan respuestas específicas¹⁴

Los TLRs se dividen de manera general en dos subtipos, en función de su localización celular y de sus ligandos. El primer grupo se compone de TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 Y TLR11, que se expresan en la superficie celular y reconocen componentes de la membrana como lípidos, lipoproteínas y proteínas¹⁴ (**Figura 1**).

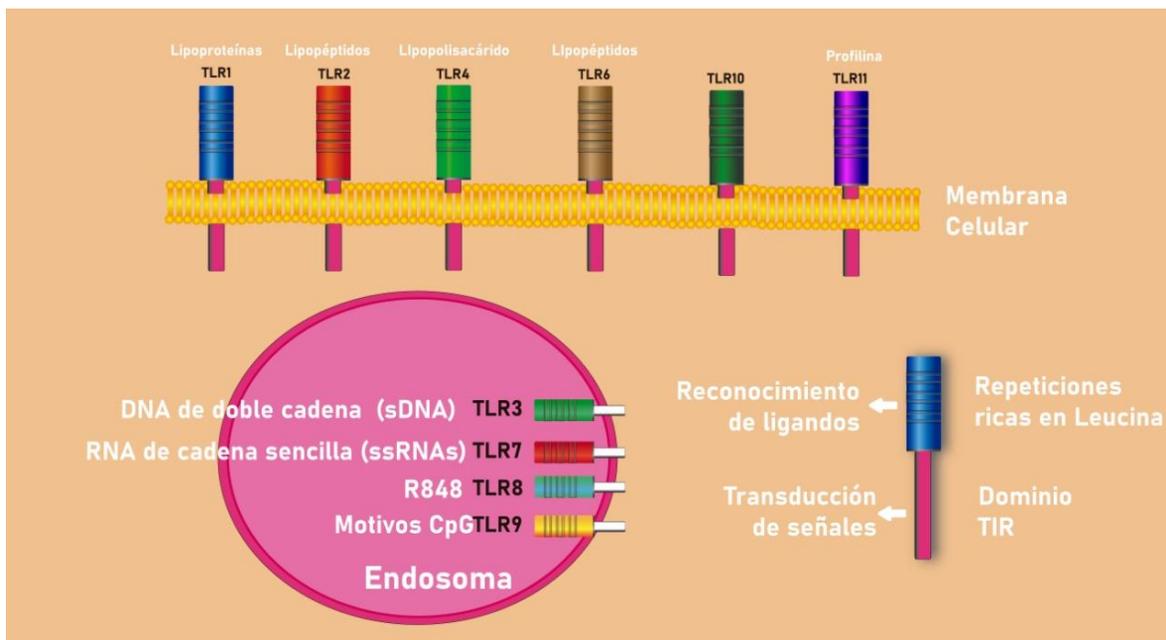


Figura 1. Estructura y ubicación celular de los TLRs. Los TLRs de superficie como TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR11 reconocen principalmente componentes estructurales de microorganismos. Por otro lado, los TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se expresan generalmente en compartimentos intracelulares y reconocen ácidos nucleicos.

El segundo grupo se compone por el TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9, que se expresan generalmente en los compartimentos intracelulares como el retículo endoplásmico, endosomas, lisosomas y endolisosomas, y reconocen ácidos nucleicos y RNA virales y/o sintéticos¹⁴. TLR3 puede reconocer RNA viral de doble cadena (dsRNA), que se genera por los virus durante la infección. TLR7 reconoce a la familia de las imidazoquinolinas, el imiquimod y el resiquimod, además de reconocer RNA viral de cadena simple (ssRNA)¹⁶.

Los TLRs se expresan en células del sistema inmune como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y células NK, así como por algunas células no inmunes como las neuronas, los astrocitos, entre otros¹⁷, por lo que los TLRs pueden ser activados por una combinación de patrones moleculares asociados a microorganismos (PAMPs) y/o patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) durante trastornos inflamatorios del sistema nervioso central.

2.4.1 Vía de señalización

El reconocimiento de los diferentes ligandos por parte de los TLRs permite que los receptores se puedan homodimerizar, formando dímeros de la misma molécula o en algunos casos que ocurra la heterodimerización (TLR2 dimeriza con TLR1 o TLR6). En ambos casos, la dimerización de los TLR activa cascadas de señalización que culminan en la expresión de genes específicos¹⁸.

Dependiendo del TLR, la activación del receptor puede finalizar en la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B), las proteínas quinastas activadas por mitógeno (MAPK) y/o las vías de señalización del factor regulador del interferón (IRF) los cuales regulan la expresión de diversos genes involucrados en la respuesta inflamatoria, proliferación, autofagia, invasión, migración y muerte celular entre otros procesos¹⁹. Como molécula común a la señalización de los TLRs excepto al TLR3¹⁴, se encuentra la proteína adaptadora MyD88 (molécula adaptadora central del gen de respuesta primaria de diferenciación mielóide)¹⁷. La proteína MyD88 posee en su estructura un dominio intracelular TIR (Toll/IL-1R) en el extremo carboxilo y un dominio de muerte en el extremo amino.

Al unirse el TLR con su ligando, el dominio TIR de MyD88 interacciona con el dominio TIR del TLR, mientras que el dominio de muerte se asocia con IRAK4 (cinasa asociada al receptor de IL-1). El complejo MyD88-IRAK4 provoca la fosforilación y activación de IRAK1 permitiendo así una interacción con el factor 6 asociado de TNF- α (TRAF6). Entonces, el TRAF6 se une al complejo TAK1/Tab1/2/3, el cual provoca la fosforilación y activación del complejo IKK, que finalmente libera al NF- κ B de su inhibidor I- κ B mediante su ubiquitinación y degradación. El NF- κ B es translocado al núcleo, en donde induce la activación de

la transcripción de diversos genes que codifican para moléculas que participan en la respuesta inmune, como son: mediadores inflamatorios, citocinas y quimiocinas¹⁷ (**Figura 2**).

La activación del complejo TAK1/Tab1/2/3 permite el reclutamiento de MAPKs, que a su vez va a provocar la fosforilación de las quinasas MEK que son activadoras de las proteínas ERK (quinasa regulada por señal extracelular), JNK (quinasa N-terminal de Jun) y la isoforma p38, permitiendo así la fosforilación del factor de transcripción de AP-1 (c-Fos/c-Jun) y su translocación al núcleo²⁰ (**Figura 2**).

Además, el complejo MyD88-IRAK4 induce la interacción con un complejo de TRAF3, reclutando a la proteína IRAK-1 cuya fosforilación es capaz de activar el factor regulador de interferón 7 (IRF-7) induciendo la transcripción de los genes que codifican para los IFN tipo I ²¹.

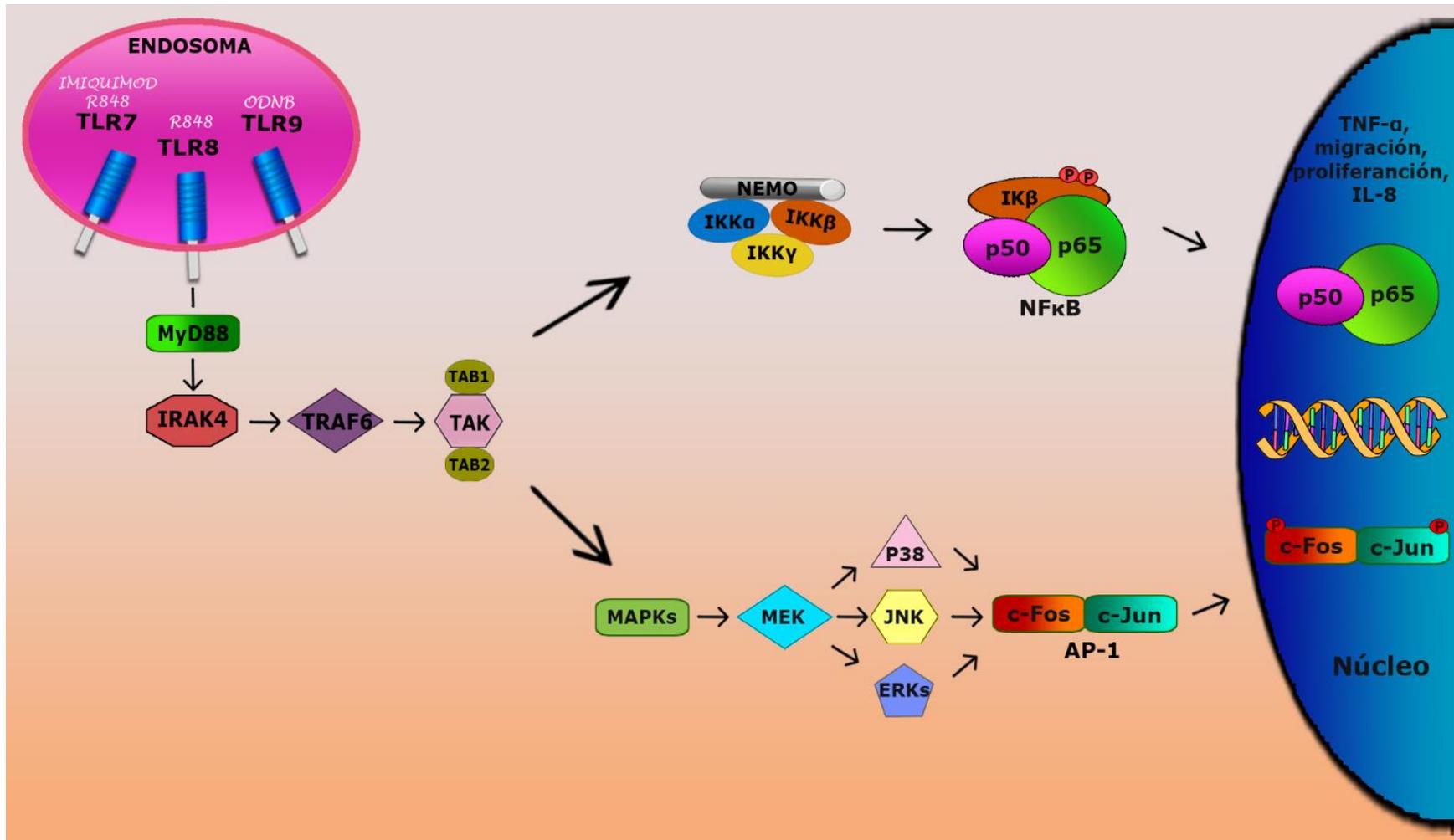


Figura 2. Principales vías de señalización inducidas a través de la activación de TLR7, TLR8 y TLR9. La activación de los TLRs desencadena cascadas de señalización que llevan a la activación de factores de transcripción, permitiendo así la expresión de diversos genes involucrados en diferentes procesos celulares.

2.5 Migración y proliferación celular

El cáncer implica entre otras cosas la proliferación celular descontrolada, la invasión, la angiogénesis y la metástasis. Se sabe que el cáncer es influenciado por el microambiente que lo rodea, uno de los componentes de gran importancia en este ambiente son las citocinas producidas por las células tanto inmunes como tumorales²².

Las células cancerosas poseen diversos mecanismos de migración, invasión y proliferación, tanto individuales como colectivas, los cuales son parámetros críticos en la diseminación metastásica, la principal causa de muerte en pacientes con cáncer¹⁹. La comunicación entre las células está mediada por receptores de adhesión diméricos transmembranales, mejor conocidos como integrinas, con los cuales las células se adhieren o son capaces de migrar. Al iniciar la migración, las células cancerosas experimentan cambios moleculares al remodelar su adhesión célula-célula, matriz celular y su citoesqueleto de actina²³. En los tejidos epiteliales, las células se adhieren entre sí mediante moléculas de adhesión formando uniones intercelulares especializadas, las proteínas de adhesión incluyen a las cadherinas.

Existen diferentes tipos de migración; la migración mesenquimatosa de células individuales, la migración ameboidea y la migración celular colectiva, la cual está implicada en la propagación de tumores. La pérdida de la molécula de adhesión célula-célula E-cadherina en el cáncer de células epiteliales así como la emisión de señales promotoras, permite la conversión de células epiteliales diferenciadas en células mesenquimales, migratorias e invasoras, un proceso denominado transición epitelio-mesenquimal, en el que para abandonar el tumor primario, las células disuelven sus contactos célula-célula y siguen una ruta quimioattractiva a través de la matriz extracelular, facilitada por proteasas secretadas. Las células tumorales pierden entonces su morfología y migran a un sitio para formar una nueva estructura, la pérdida de la expresión de E-cadherina sirve como un indicador clínico de mal pronóstico y metástasis^{24, 25}.

La capacidad de migrar de las células es crítica en el desarrollo del cáncer. La migración celular es sensible a las señales extracelulares, que pueden ser factores difusibles, señales de células vecinas y señales del microambiente. La interacción de las células tumorales con el microambiente induce la secreción autocrina o paracrina de factores de crecimiento y citocinas, que pueden desencadenar la transición epitelio-mesenquimal. Estudios han encontrado que existe una gran asociación entre las vías de señalización y los factores de crecimiento con la metástasis en el cáncer, debido a que algunas vías de señalización como la de NF- κ B o la MAPK se activan estimulando la producción de citocinas en el microambiente tumoral principalmente IL-8, TNF- α e IL-1 β , las cuales permiten que se establezca

una respuesta que favorezca el desarrollo del tumor, desencadenando el movimiento celular o una respuesta antitumoral que permita su erradicación^{22, 26}.

La transición epitelio-mesénquima es muy compleja, e involucra una gran cantidad de vías de señalización, que controlan la expresión de E-cadherina, cuya desregulación conduce a la pérdida de uniones intercelulares. Se ha reportado que la inducción del NF- κ B regula la expresión de una gran cantidad de genes cuyos productos pueden, promover la invasividad del tumor respaldando su progresión, invasión de los tejidos circundantes, angiogénesis y metástasis²⁷.

Se ha observado que diferentes factores de crecimiento y sus vías de transducción de señales activadas provocan la pérdida de la función de E-cadherina induciendo la migración, como TGF β y el EGF²⁸, la activación de represores transcripcionales como Snail e incluso la fosforilación mediante el receptor tirosina quinasa.²⁹ La pérdida de la función de E-cadherina, conduce a una interrupción de adherencias y uniones estrechas y a la pérdida de polaridad celular, liberando proteínas del complejo de adhesión celular citoplasmático.

La mayoría de los estudios sobre TLRs se han centrado en su expresión y función en las células del sistema inmune, sin embargo, recientemente, la expresión y función de TLRs en las células cancerosas y su asociación con la progresión tumoral se ha convertido en un campo muy activo. Estudios han encontrado un nivel elevado de TLRs en diversas células tumorales, sin embargo, los TLRs pueden desempeñar papeles duales con resultados contradictorios^{30,31}. Se sabe que la activación de NF- κ B conduce a un aumento en el nivel de producción de citocinas como IL-1, IL-6, IL-10 y TNF- α , lo que puede promover la supervivencia y progresión tumoral debido a la inhibición de la apoptosis, y la inducción de angiogénesis³².

3. ANTECEDENTES

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) son un grupo de neoplasias que se originan en diferentes tipos de células pluripotentes y diferenciadas. La mayor incidencia de tumores primarios del SNC en adultos es de meningiomas y tumores neuroepiteliales, mientras que en niños y adolescentes se presentan mayormente tumores embrionarios, principalmente el meduloblastoma³³. Los tratamientos clínicos actuales (quimioterapia, radioterapia craneoespinal y resección quirúrgica) a menudo tienen éxito; sin embargo, los pacientes manifiestan efectos secundarios que afectan su función neurológica y su calidad de vida. Debido a esto, el entendimiento de la biología de tumor constituye un área de oportunidades en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

Se ha descrito que los TLRs están presentes en diferentes tipos celulares además de las células del sistema inmune, como progenitores neurales, neuronas maduras y células tumorales entre otras¹³. Como los estudios realizados por Chun *et al.* en 2013 que detectaron la expresión de TLRs en células del cáncer de pulmón Lewis (LLC)³⁴. Por otro lado, la investigación realizada por Andaloussi *et al.* en 2006 revelaron la expresión de TLRs en glioma humano y murino, además demostraron que el TLR9 se ve sobreexpresado en esas células y al realizar la estimulación con ODNs se promovió la apoptosis del glioma, prolongando la supervivencia de los ratones con tumores cerebrales experimentales³⁵.

Actualmente, se conoce que la modulación de la señalización de los TLRs puede tener efectos antitumorales o pro-tumorales sobre la progresión tumoral dependiendo del TLR y del tipo de cáncer. Es el caso de la activación de TLR9 que promueve la invasión de las células en el cáncer oral humano, mientras que la activación del TLR5 en las células de adenocarcinoma de glándulas salivales promueve la migración y la invasión a través de la estimulación por flagelina^{36,37}.

En relación con los tumores de SNC y los TLRs, Buonfiglioli *et al.* recientemente mostraron que en glioblastoma humano y murino existe una alta expresión de TLR7 y, al activarlo mediante el miRNA Let-7 se observó una atenuación de la migración celular, disminuyendo el crecimiento del glioma³⁸.

La activación de NF- κ B inducida por la activación de agonistas de TLR7 y TLR8 en células tumorales de pulmón, indujo un aumento de la sobrevivencia de las células tumorales y quimiorresistencia, lo cual sugiere que la activación de los TLRs puede favorecer directamente el desarrollo del tumor³⁹.

Dada la evidencia anterior, es primordial comprender el impacto funcional de la expresión y activación de los TLRs en las células tumorales, por lo que se requiere una mayor investigación. Estudios han reportado que los TLRs pueden desempeñar un papel importante en pacientes con meduloblastoma. El estudio realizado por

Danuta *et al.* evidenció una alta expresión de TLR2 y TLR3 asociados a células tumorales de meduloblastoma, sugiriendo que juegan un papel importante en la angiogénesis tumoral⁴⁰.

En el caso específico de los meduloblastomas, solo existe un antecedente de un estudio en el que se describió la expresión de los TLR2, TLR3 y TLR9 en las células gliares, mientras que en el grupo de trabajo se estudió la presencia de TLRs en biopsias de pacientes con meduloblastoma, detectándose los receptores TLR7 y TLR8; no obstante, se desconoce la función que tienen estos receptores en la respuesta pro y/o antitumoral en meduloblastomas. Por lo tanto, establecer el contexto inmunológico que predomina en las células tumorales y el efecto de la activación de los TLRs expresados en los meduloblastomas, son aspectos importantes para el entendimiento de la biología del tumor.

4. JUSTIFICACIÓN

El meduloblastoma es uno de los tumores cerebrales infantiles malignos de mayor frecuencia, que posee una amplia heterogeneidad y donde el desarrollo de metástasis favorece la posibilidad de recaída posterior al tratamiento. La expresión de los TLRs se ha identificado en células de meduloblastoma; sin embargo, no se conoce aún su participación en los mecanismos de migración celular.

El entendimiento del mecanismo de activación de los TLRs en el meduloblastoma, puede significar una herramienta de gran utilidad en la búsqueda y mejora de tratamientos terapéuticos.

5. HIPÓTESIS

La activación de los receptores TLR7, TLR8 y TLR9 provocará la disminución de la capacidad de migración de las células de meduloblastoma.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la activación de los receptores TLR7, TLR8 y TLR9 sobre la capacidad de migración de la línea celular DAOY.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la capacidad de migración de células DAOY, activando a los receptores TLR7, TLR8, y TLR9 con ligandos sintéticos.
- Identificar la vía de señalización involucrada en la migración de células DAOY, inducida por la activación de los TLR7, TLR8 y TLR9.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Cultivo celular

Se utilizaron células DAOY (ATCC HTB-186™) derivadas de meduloblastoma desmoplásico humano, de varón de 4 años. Fueron cultivadas en medio EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) (ATCC) complementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (SFB, Biowest) y antibiótico antimicótico (1mL/100mL) y mantenidas a 37°C con CO₂ 5% y 5% de humedad.

8.2 Ensayos de migración

Estría en monocapa.

Se determinó la capacidad de migración de las células DAOY utilizando placas de 12 pozos, colocando en cada uno 5 x 10⁵ células/mL de medio EMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, se incubó por 24 horas a 37°C con 5% de CO₂ y 5% de humedad. Posteriormente, se realizó una herida en la monocapa utilizando puntas estériles de 200 µL. Se retiró el medio y se añadió medio EMEM sin suero fetal bovino y colchicina 0.01 µM. Se utilizaron como estímulos independientes a una concentración de 1 µg/mL R848, imiquimod, dos diferentes ODN tipo B (ODNB1 y ODNB2, 1 µg/mL), un control ODNB1 para corroborar la especificidad (1 µg/mL) y un ODN inhibidor para corroborar a participación de los receptores TLR8 y TLR 9 (ODNinh 1 µg/mL, 5 µg/mL y 10 µg/mL) (**Tabla 2**). Se tomaron fotografías como seguimiento de la evolución de cierre de la estría a las 0 y 24 h a un objetivo de 5x. Una vez observado el cierre de estría las células se fijaron con etanol 100% y se tiñeron con violeta de Genciana. Las imágenes capturadas fueron analizadas calculando el área sin cicatrizar con el programa Fiji ImageJ.

Tabla 2. Ligandos sintéticos utilizados.

Receptor	Ligando	Marca
TLR7 y TLR8	R848	INVIVOGEN
TLR7	Imiquimod	INVIVOGEN
TLR9	ODN tipo B (ODNB1)	Miltenyi Biotec
TLR9	ODN tipo B (ODNB2)	Miltenyi Biotec
TLR7, TLR8 y TLR9	ODN 2088 (ODNinh)	Miltenyi Biotec
	ODN control (control ODNB1)	Miltenyi Biotec

Cámaras transwell

Se evaluó la capacidad de migración de las células DAOY empleando cámaras Transwell con una densidad de 1×10^5 células/mL de medio EMEM sin complementar y colchicina $0.01 \mu\text{M}$ para inhibir la proliferación celular. Se utilizaron de manera independiente los estímulos R848 (Invivogen) e imiquimod (Invivogen) en concentración de $1 \mu\text{g/mL}$. En el pozo inferior de la cámara se agregó 1 mL de medio EMEM suplementado con suero fetal bovino 10% como quimioatrayente. Se dejaron incubar a 37°C con 5% de CO_2 y 5% de humedad por 24 h. Posteriormente, se fijaron las células en la membrana con etanol al 100%, se retiró la membrana del inserto y se tiñó con violeta de Genciana. Las membranas fueron montadas en portaobjetos para la toma de fotografías (5 zonas representativas por membrana) a un objetivo de 10x. La cuantificación de células se realizó con el programa Fiji ImageJ. Los resultados obtenidos fueron graficados como porcentaje de migración, considerando al total de las células sin ningún estímulo (control) como el 100%.

8.3 Extracción de proteínas.

Extractos totales

Se cultivaron 7×10^5 células en placas de 6 pozos en 1.5 mL de medio EMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, incubándose por 24 h a 37°C con 5% de CO_2 y 5% de humedad. A continuación, se utilizaron como estímulos independientes imiquimod, R848, ODNB1, ODNB2, control ODNB1 y LPS en concentración de $1 \mu\text{g/mL}$ durante 15 min. La proteína total de las células se extrajo utilizando el amortiguador de extracción RIPA (Tris-HCl pH 7.5 [50 mM]; EDTA [1 mM]; NaCl [100 mM]; Nonidet P-40 1 %) además de EDTA 0.05 mM (Thermo Scientific), inhibidor de proteasas (Protease inhibitor Cocktail, Thermo Scientific) e inhibidor de fosfatasa (Thermo Scientific). El extracto obtenido se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min a 4°C . EL sobrenadante se recuperó y almacenó a -20°C .

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford utilizando el reactivo Protein Assay (BioRad) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Extractos nucleares y citoplasmáticos

Se cultivaron 7×10^5 células por triplicado en placas de 6 pozos en 1.5 mL de medio EMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, incubándose por 24 h a 37°C con 5% de CO_2 y 5% de humedad. A continuación, se utilizaron como estímulos

independientes imiquimod, R848, ODNB1, ODN control y LPS en concentración de 1 µg/mL. La fracción citoplasmática se obtuvo utilizando amortiguador de extracción citoplasmática (HEPES [10 mM] pH 7.9, KCl [10 mM], EDTA [0.1 mM], Nonidet P-40 0.3%) además de EDTA 0.05 mM (Thermo Scientific), inhibidor de proteasas (Protease inhibitor Cocktail, Thermo Scientific) e inhibidor de fosfatasa (Thermo Scientific), incubándose por 5 min. El extracto obtenido se centrifugó a 3000 rpm por 5 min, se reservó el sobrenadante que corresponde a la fracción citoplasmática, mientras que el pellet que contiene la fracción nuclear se resuspendió en amortiguador de extracción citoplasmática sin Nonidet P-40 y se centrifugó a 3000 rpm por 5 min 2 veces más. La fracción nuclear se obtuvo resuspendiendo el pellet en amortiguador de extracción nuclear (HEPES [20 mM] pH 7.9, NaCl [0.4 M], EDTA [1 mM] y glicerol 25%) además de EDTA 0.05 mM (Thermo Scientific), inhibidor de proteasas (Protease inhibitor Cocktail, Thermo Scientific) e inhibidor de fosfatasa (Thermo Scientific) incubándose por 10 min. Finalmente, se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a 4°C, recuperando el sobrenadante y almacenándose a -20°C.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford utilizando el reactivo Protein Assay (BioRad) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

8.4 Electroforesis en gel de acrilamida

A los extractos proteicos se les añadió amortiguador LDS 4x (dodecilsulfato de litio, pH 8,4) con β-mercaptoetanol y se calentaron por 5 min a 95°C. Las muestras se cargaron en geles de acrilamida al 10% de 1.5 mm de ancho ajustándose a una cantidad de proteína de 80 µg. Las proteínas se separaron por electroforesis (Mini Protean, BioRad) a 80 V utilizando amortiguador de corrida (SDS 10%, amortiguador de proteínas 10X, pH 8.3).

8.5 Western blot

Se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF (Merck Millipore). La transferencia se realizó a 300 mA. Luego la membrana se bloqueó por 1 h usando una solución de leche desnatada al 5% en TBS-Tween. Posteriormente la membrana se incubó con el anticuerpo primario según correspondía toda la noche a 4°C (**Tabla 3**). Finalmente se lavó la membrana con PBS-Tween y se agregó el anticuerpo secundario por 2 h a temperatura ambiente (**Tabla 3**). Una vez que las incubaciones finalizaron se realizó la detección por quimioluminiscencia utilizando el reactivo de revelado (ImmunoCruz, Santa Cruz) siguiendo las instrucciones del fabricante, a diferentes tiempos en el fotodocumentador Fusion S (Vilber) con el

programa EvolutionCapt. Las bandas fueron analizadas mediante el software Fiji ImageJ. La β -actina se utilizó como control de carga. Los experimentos se repitieron al menos 3 veces.

Tabla 3. Concentración de anticuerpos utilizados para western blot.

Anticuerpo	Dilución	Clase	Isotipo	Marca
Anti- β -actina	1:8000	Monoclonal	Rabbit IgG	Abcam
Anti-NF- κ B p65	1:5000	Policlonal	Mouse IgG	Invitrogen
Anti-p-cJun	1:1000	Policlonal	Mouse IgG	Abcam
Anti-lamina A/C	1:1000	Monoclonal	Mouse IgG	Abcam
Anti-Rabbit IgG	1:5000	----	----	Santa Cruz
Anti-Mouse IgG	1:5000	----	----	Santa Cruz

8.6 Análisis Estadístico

Se determinaron los valores promedio del área y la densidad óptica de proteínas de por lo menos tres diferentes experimentos y su error estándar de la media (SEM). Las diferencias de los valores de las muestras con diferentes tratamientos y los valores de las muestras sin tratamiento se determinaron por la prueba de t-student y U de Mann-Whitney cuando así fue requerido. Para el análisis se utilizó el programa GraphPad Prism 5. Un valor de $P < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

9. RESULTADOS

9.1 La migración de las células de meduloblastoma es afectada por la activación de los TLRs

La migración de las células cancerígenas es fundamental para el proceso de metástasis. Nosotros determinamos la capacidad de migración de las células tumorales y el efecto de la activación de los TLRs mediante ensayos de cierre de estría.

Los resultados obtenidos muestran que la activación de TLR7 y TLR9 por imiquimod y ODNB1 respectivamente, disminuyó significativamente la capacidad de migración de las células de meduloblastoma con respecto a las células control (**Figura 3A-B**). A pesar de que se observó una inhibición de la capacidad de migración con el ODNB2 esta diferencia no resultó ser estadísticamente significativa. El control ODNB1 no mostró capacidad alguna de activar al TLR9 ya que es un oligonucleótido que se une al receptor y no permite que sea activado, por lo que observamos que su comportamiento es igual al control, lo cual nos permite afirmar que la actividad observada por los ODN tipo B es específica.

Para explorar la participación de los TLR7 y TLR8 durante la migración celular, se utilizaron cultivos de células en cámaras transwell por 24 h (**Figura 4A**). De acuerdo con los datos, los cultivos de células de meduloblastoma estimulados con imiquimod mostraron un aumento en la migración celular, mientras que las células estimuladas con R848 parecen estar teniendo un efecto contrario, aunque ambos efectos no son estadísticamente significativos (**Figura 4B**).

Por otro lado, para corroborar si el TLR7 y el TLR8 estaban participando o no en la migración de células de meduloblastoma, examinamos la capacidad de migración empleando un ODN inhibidor de la activación de los TLR7 y TLR8 a diferentes concentraciones, empleando ensayos de estría en monocapa (**Figura 4C**) y preincubando 30 min antes de la estimulación con R848. En los resultados obtenidos se puede observar un aumento en la capacidad de migración en las células tratadas previamente con el inhibidor de los TLRs (**Figura 4D**), aumentando la cantidad de células que migraron conforme aumenta la concentración del inhibidor, revirtiendo el efecto de la activación de los TLR7 y TLR8 sobre la migración celular.

Sin embargo, la inhibición de los TLRs como puede observarse tiene el efecto contrario a una concentración mayor (10µg/ml), lo que sugiere la existencia de otros mecanismos de activación del oligonucleótido en esta línea celular, ligada a la activación mediada por los TLRs.

Estos resultados nos indican la participación de TLR7 y TLR8 en la capacidad de migración de las células de meduloblastoma inducida por el imiquimod y R848.

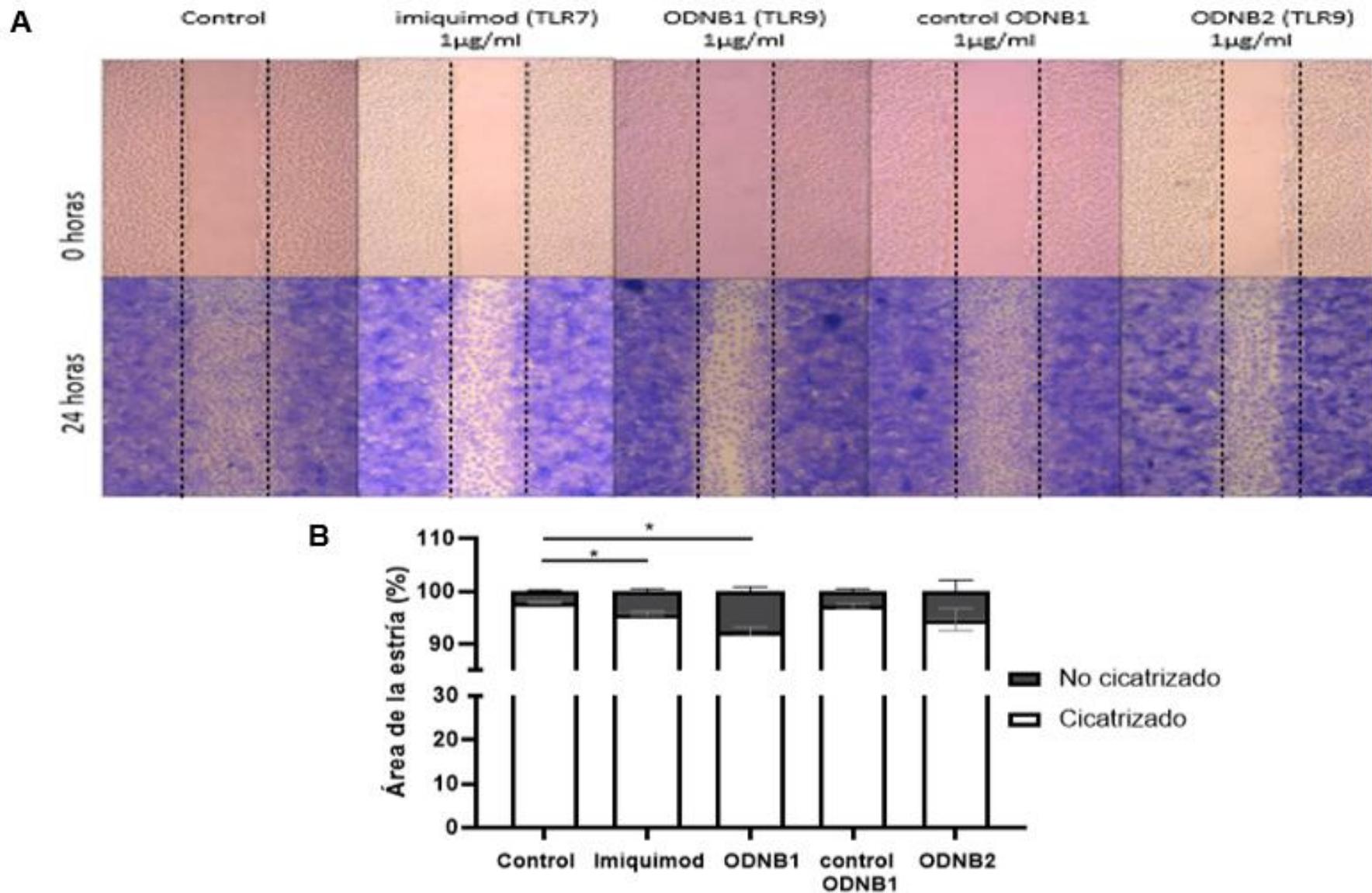


Figura 3. Efecto de la activación de TLR7 y TLR9 en las células de meduloblastoma. Las células fueron estimuladas con Imiquimod, ODNB1, ODNB2 y un control ODNB1 durante 24 h. A) Imágenes representativas de la migración de las células de meduloblastoma realizada por estría en monocapa. B) Cuantificación de la migración. Las barras representan un promedio de 8 experimentos independientes realizados por duplicado \pm SEM, * $p < 0.05$.

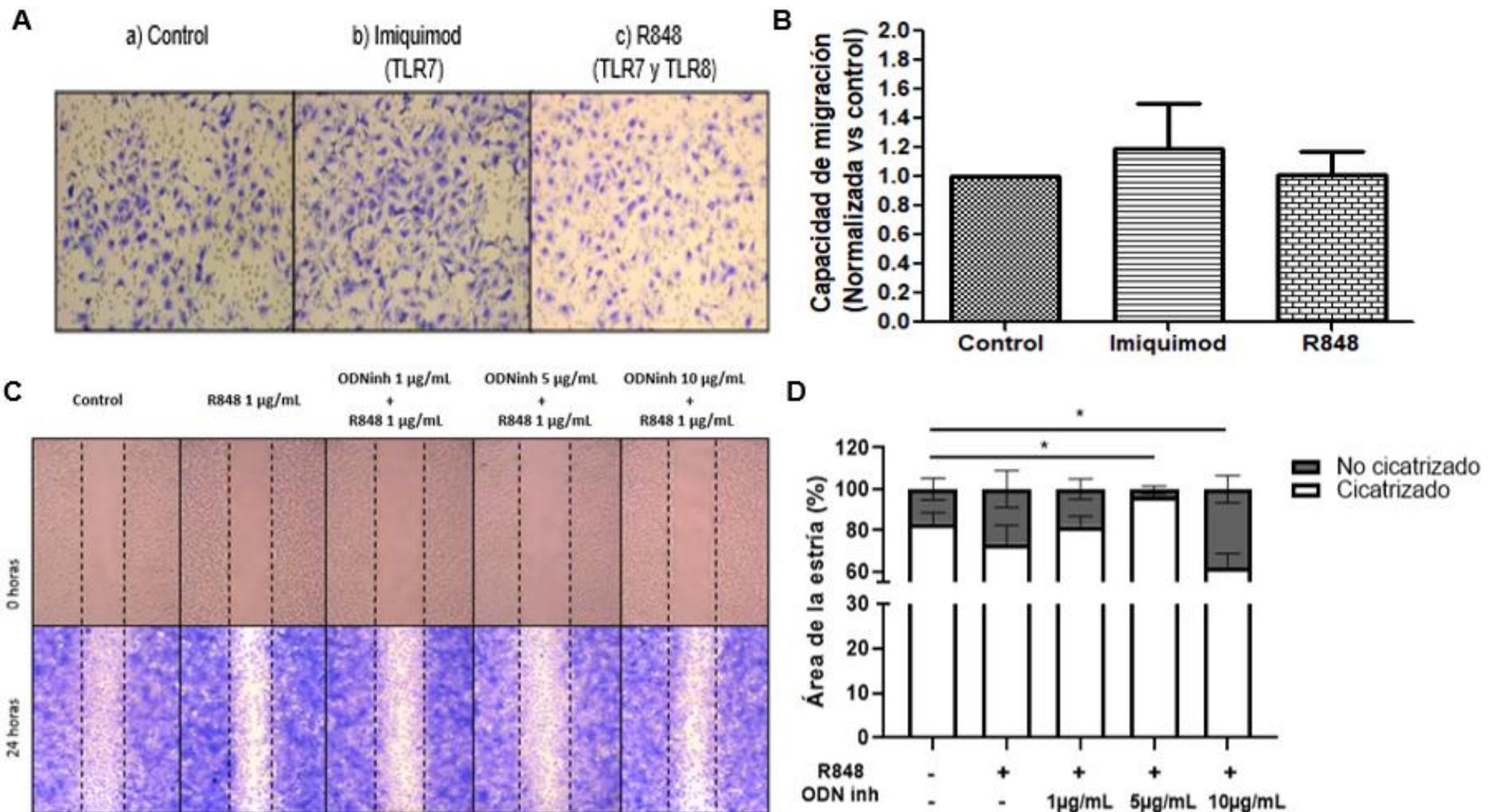


Figura 4. Efecto de la inhibición de los TLR7 y TLR8. A) Ensayo de migración en cámara transwell, imagen representativa. Las células fueron tratadas con imiquimod y R848 por 24 h utilizando como quimioatrayente suero fetal bovino. B) Cuantificación de la migración. Las barras representan un promedio de 5 experimentos independientes \pm SEM. C) Imagen representativa. Mediante un oligonucleótido sintético se llevó a cabo la inhibición de los TLRs, preincubando con R848, revirtiendo el efecto provocado por el R848. D) Cuantificación de la migración de las células DAOY. Las barras representan un promedio de 3 experimentos realizados por duplicado \pm SEM, * p <0.05.

9.2 Los niveles de NF- κ B disminuyen en la estimulación de los TLRs en células de meduloblastoma

Dado que los resultados anteriores nos sugirieron una posible participación de los TLR7, TLR8 y TLR9 en la migración de las células de meduloblastoma y ya que la activación de los TLRs induce la activación de factores de transcripción como NF- κ B y AP-1. Se determinó el nivel NF- κ B en células de meduloblastoma estimuladas con R848, Imiquimod, ODNB1, y un control ODNB1, a los 15 min en comparación con las células que no fueron estimuladas (**Figura 5A**).

En los resultados se observó una gran cantidad de NF- κ B basal expresada por las células de meduloblastoma sin ningún tratamiento, mientras que, al llevarse a cabo la estimulación por 15 min de los TLRs, la cantidad de NF- κ B expresada en cada tratamiento se ve disminuida (**Figura 5B**).

En las células en reposo, la señalización de NF- κ B está bloqueada por I- κ B α en el citosol. Al activarse el complejo cIAP/TRAF I- κ B α se fosforila y se degrada, lo que conduce a la translocación nuclear de las subunidades p65/p50 de NF- κ B y la subsecuente activación transcripcional de los genes diana de NF- κ B (IL-8, proteína quimioatrayente de monocitos 1, entre otros.)⁴¹.

Para examinar la cantidad de NF- κ B activa se realizaron extracciones fraccionadas de proteína citoplasmática y de proteína nuclear a diferentes tiempos (15 y 60 min).

Se utilizó como control endógeno de la correcta separación de la fracción nuclear a la proteína Lamina A/C (**Figura 6A**). Los resultados obtenidos muestran que para el tiempo de 15 min existe mayor presencia de NF- κ B en el núcleo con ODNB1 que la que está presente en el extracto citoplasmático, siendo ésta la proteína activa mientras que para los demás tratamientos la cantidad de NF- κ B presente en el citoplasma es mayor que en el núcleo (**Figura 6B**). En el tiempo de 60 min se puede observar que la cantidad de NF- κ B presente en el extracto nuclear es menor para todos los tratamientos que la observada a los 15 min y no es mayor a la proteína presente en los extractos citoplasmáticos sugiriendo que a 60 min se regresa a un estado basal de proteína NF- κ B.

Los resultados anteriores nos sugirieron una posible participación de otros factores de transcripción tras la estimulación de los TLRs como c-Jun. Por lo cual se utilizó el anticuerpo para la proteína c-Jun en los extractos de proteínas totales obtenidas de las células de meduloblastoma estimuladas con R848, Imiquimod y oligonucleótidos sintéticos. La proteína fue detectada mediante western blot (**Figura 7A**). Los resultados muestran que hay una expresión de c-Jun basal alta en las células sin tratamiento, mientras que en la estimulación con imiquimod, R848 y

ODNB1 hay una tendencia en disminuir la cantidad de proteína c-Jun expresada a los 15 min de estimulación en todos los tratamientos (**Figura 7B**).

Por lo tanto, debido a la activación observada de c-Jun/AP-1 en las células de meduloblastoma sin estimulación, se decidió probar su localización activa en los extractos nucleares en las células de meduloblastoma. Se emplearon el imiquimod, el R848 y los oligonucleótidos anteriores para la estimulación de los TLRs a diferentes tiempos (15 y 60 min) (**Figura 8A**). En los resultados se puede observar un aumento en la cantidad de proteína c-Jun en el núcleo en la mayoría de los tratamientos a los 15 min, comparado con la expresión de c-Jun en citoplasma sin ser este efecto estadísticamente significativo. Por otro lado, a los 60 min la presencia de c-Jun en el núcleo disminuyó en todos los tratamientos hasta casi llegar a su estado basal (**Figura 8B**).

Además, se empleó como control positivo el ligando específico LPS para el TLR4 y el ligando ODN control de B1 para el TLR9 como control negativo. Se esperaba que hubiera una expresión de NF- κ B y c-Jun mayor o igual que la obtenida por el grupo control, pero debido a que el nivel basal de NF- κ B y c-Jun fue alto, no se observó el efecto esperado.

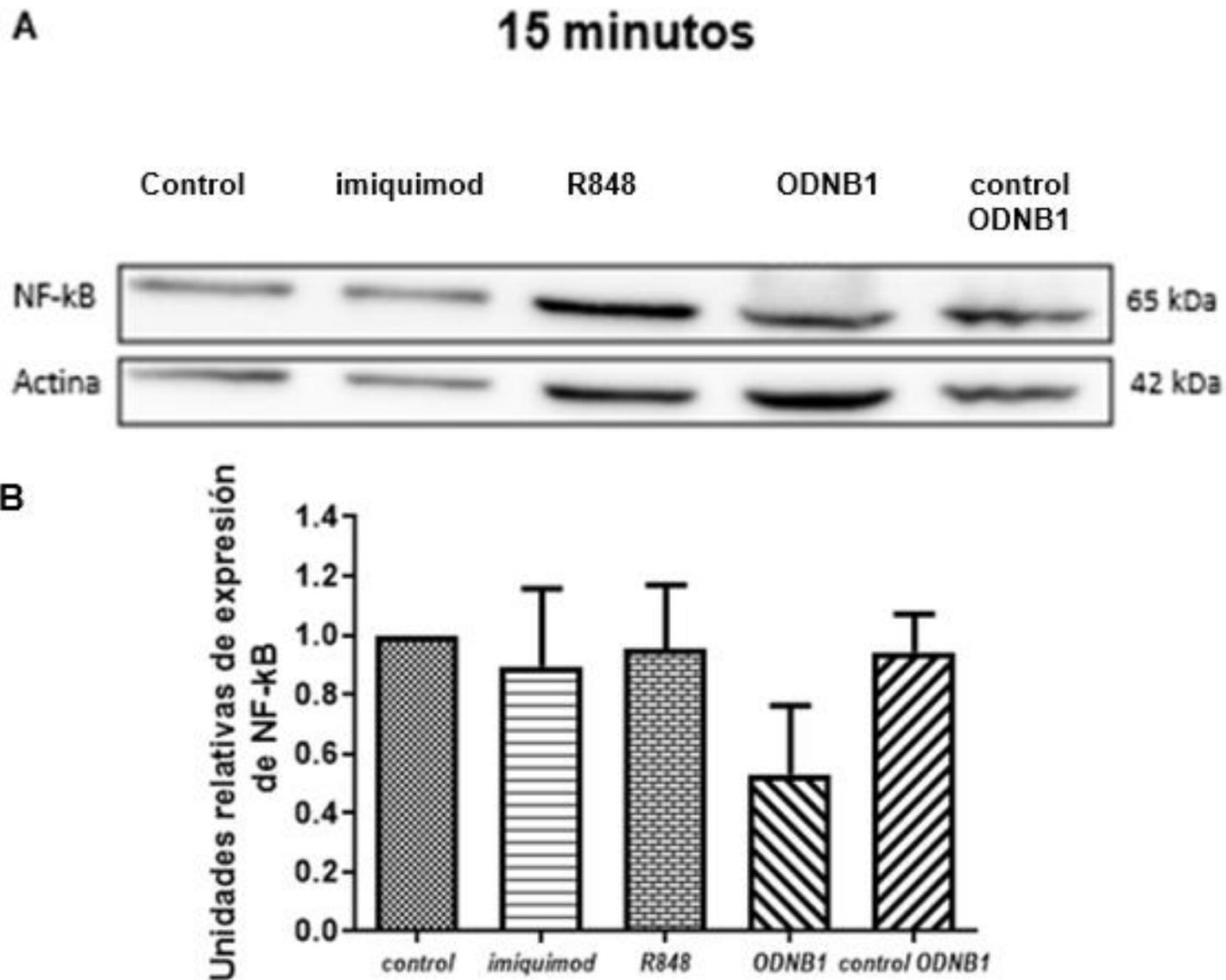


Figura 5. Activación de NF-κB en células de meduloblastoma inducida por ligandos sintéticos. (A) Imagen representativa del western blot de los extractos totales que fueron obtenidos de células de meduloblastoma estimulados con 1µg/ml de diferentes ligandos sintéticos: Imiquimod, R848, ODNB1 y control ODNB1 durante 15 min (B) Cuantificación de la densidad óptica normalizada con respecto al control. Las barras representan el promedio de dos experimentos independientes ± SEM.

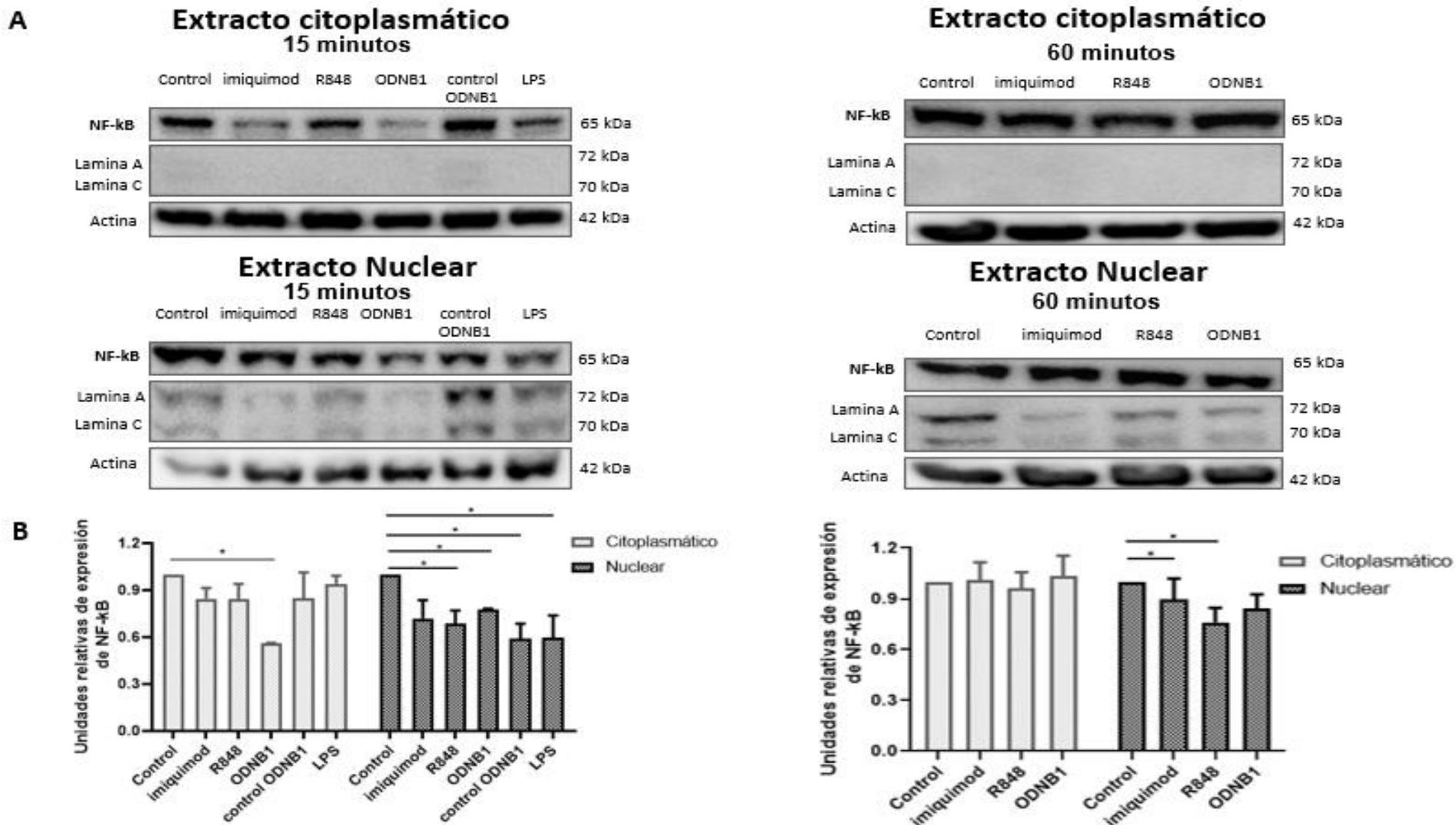


Figura 6. Expresión de NF- κ B en el núcleo. (A) Imágenes representativas de western blot. Los extractos citoplasmáticos y nucleares fueron obtenidos de células de meduloblastoma estimuladas con 1 μ g/ml de diferentes ligandos sintéticos: imiquimod, R848, ODNB1, control ODNB1 y LPS como control positivo durante 15 y 60 min para determinar la activación de NF- κ B en el núcleo mediante Western blot, utilizando como control de carga β -actina y como control nuclear Lamina A/C. (B) Cuantificación de la densidad óptica normalizada con respecto al control. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes \pm SEM, * p <0.05.

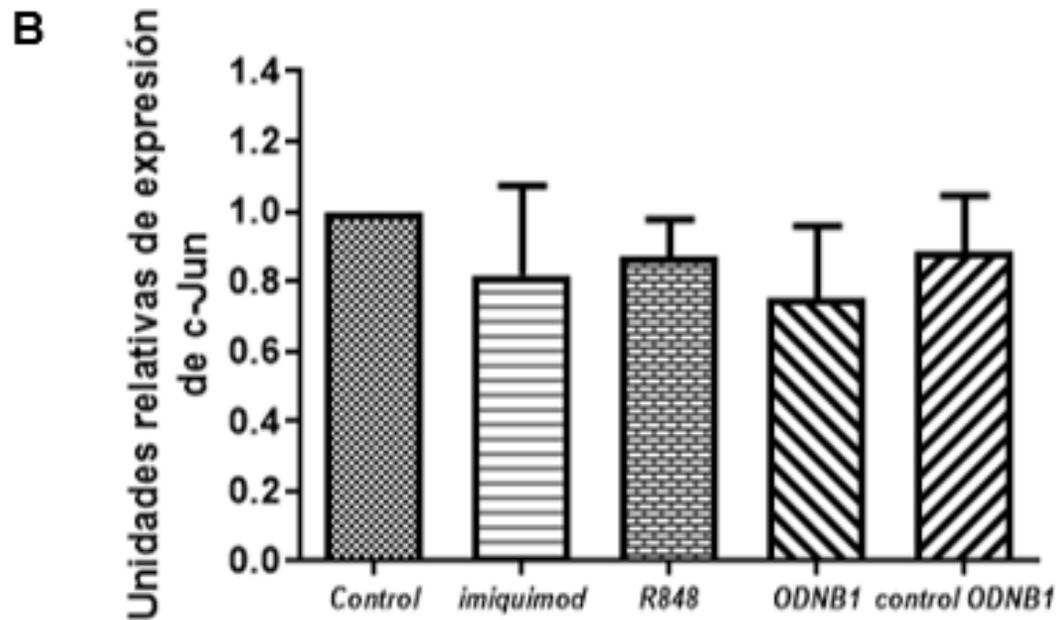
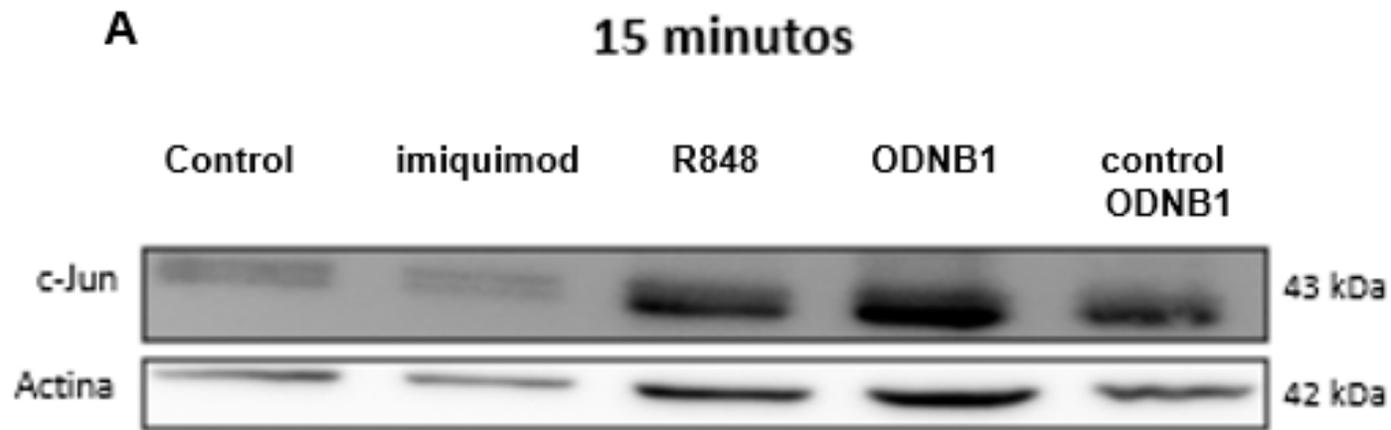


Figura 7. Activación de c-Jun en células de meduloblastoma inducida por ligandos sintéticos. (A) Los extractos totales fueron obtenidos de células de meduloblastoma estimuladas con 1 µg/ml de diferentes ligandos sintéticos: imiquimod, R848, ODNB1 y control ODNB1 durante 15 min para determinar la activación de c-Jun detectada mediante western blot. (B) Cuantificación de la densidad óptica normalizada con respecto al control. Las barras representan el promedio de dos experimentos independientes ± SEM.

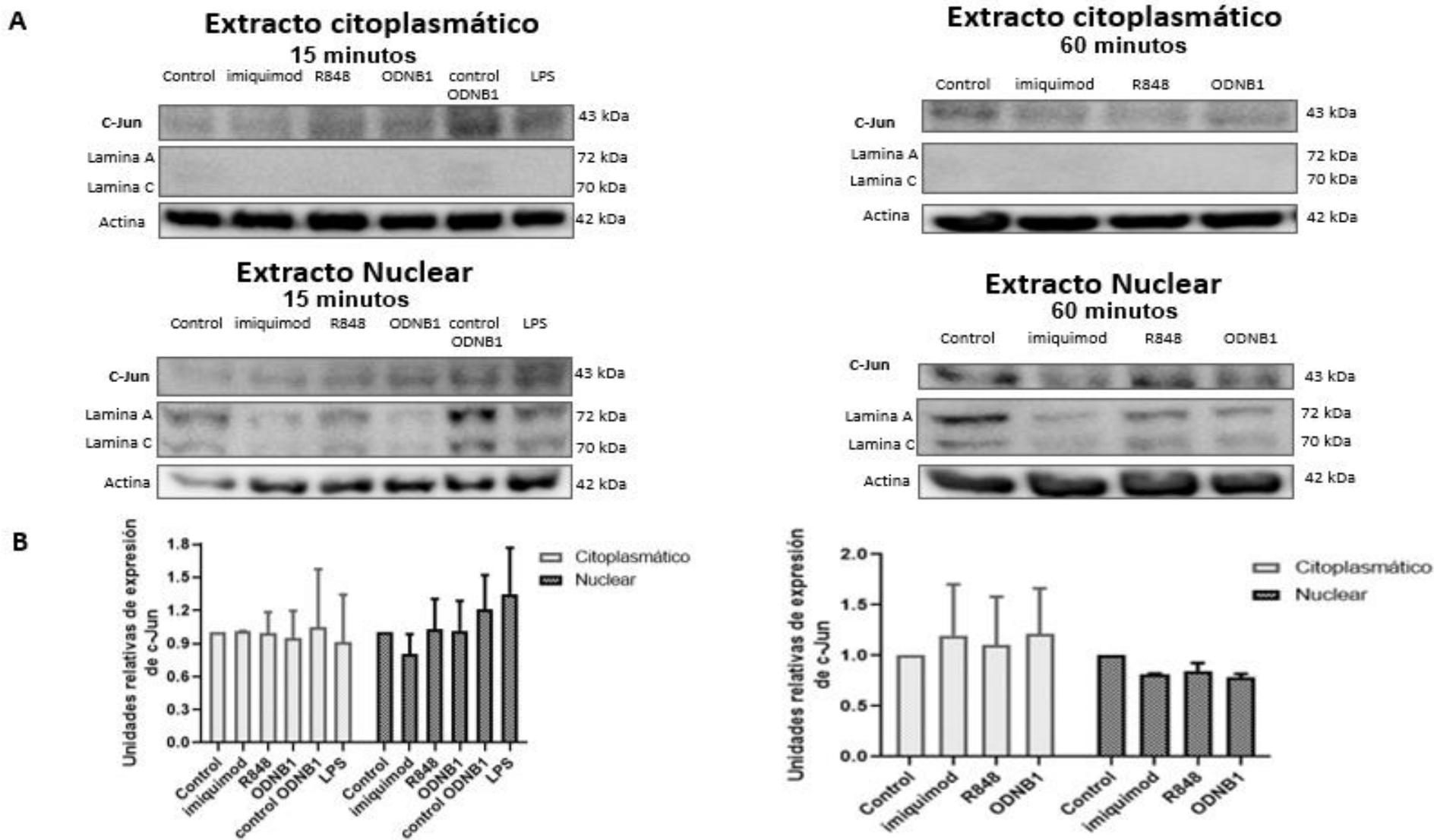


Figura 8. Expresión de c-Jun en el núcleo. (A) Los extractos citoplasmáticos y nucleares fueron obtenidos de células de meduloblastoma estimuladas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de diferentes ligandos sintéticos: imiquimod, R848, ODNB1, control ODNB1 y LPS como control positivo durante 15 y 60 min para determinar la presencia de c-Jun en el núcleo mediante western blot, utilizando como control de carga β -actina y como control nuclear Lamina A/C. (B) Cuantificación de la densidad óptica normalizada con respecto al control. Las barras representan el promedio de dos experimentos independientes \pm SEM.

Finalmente, se determinó si el comportamiento de NF- κ B observado anteriormente es específico por la estimulación de los TLRs mediante los ligandos sintéticos, empleando un inhibidor de la activación de NF- κ B en los extractos citoplasmáticos y nucleares a diferentes dosis: el PDTC que inhibe la fosforilación de I- κ B, bloqueando la translocación de NF- κ B al núcleo reduciendo la expresión de citocinas posteriores. Se observó que la cantidad de NF- κ B expresada en el citoplasma se ve disminuida para el tratamiento con R848, mientras que la expresión en los extractos nucleares está aumentada, al aumentar la dosis de PDTC, la expresión en los extractos nucleares disminuyó, mientras que en el extracto citoplasmático aumentó, lo que sugiere que la inhibición de NF- κ B es dependiente de la dosis.

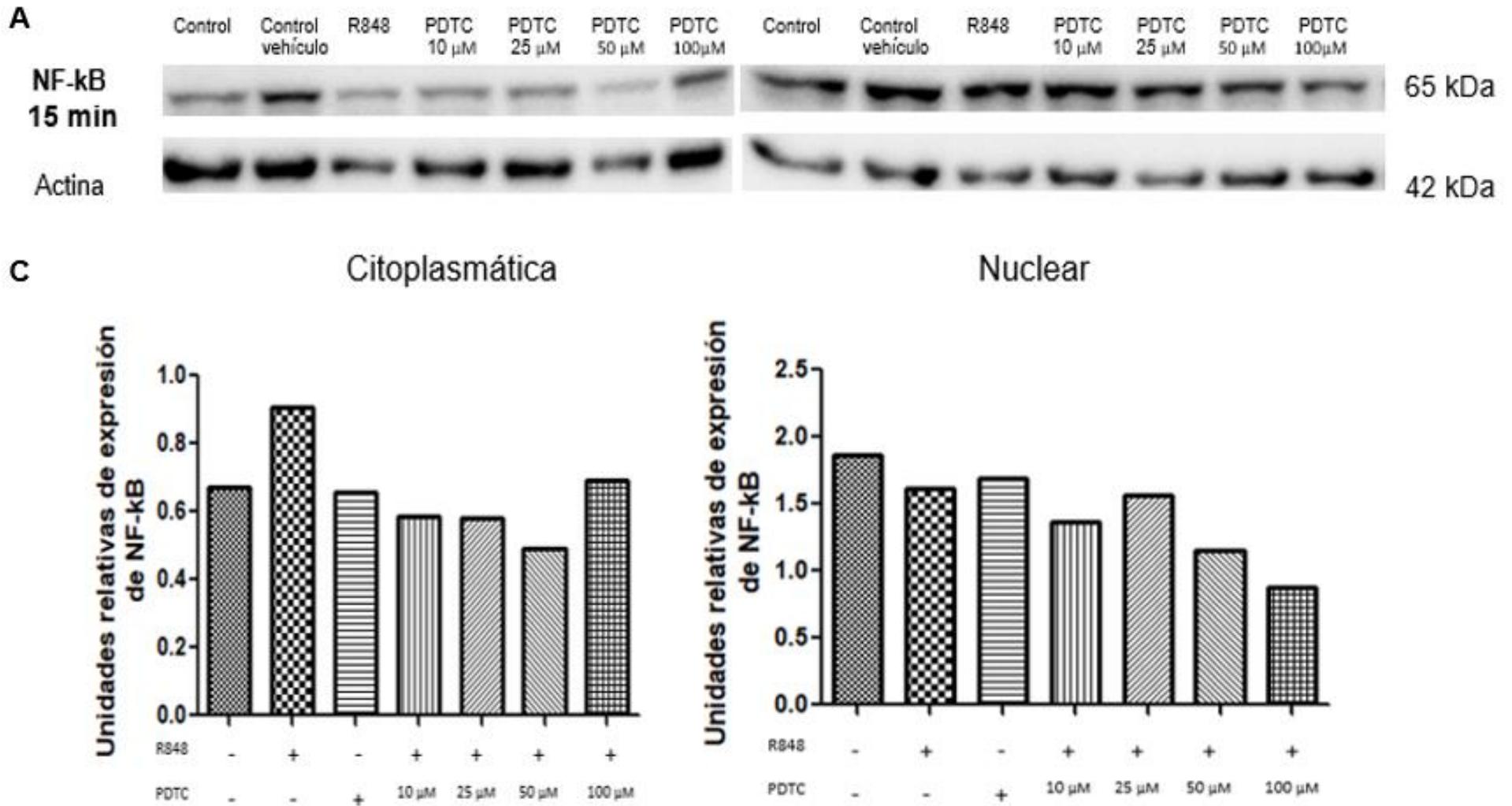


Figura 9. Estandarización de PDTC en la inhibición de NF- κ B. (A) Los extractos citoplasmáticos y nucleares fueron obtenidos de células de meduloblastoma preincubadas 30 min con PDTC a diferentes concentraciones (10, 25, 50 y 100 μ M) y estimuladas con 1 μ g/ml de R848 durante 15 min. (B) Cuantificación de la densidad óptica normalizada con respecto al control.

10. DISCUSIÓN

Después de la leucemia aguda, el tumor cerebral es la segunda neoplasia maligna más común en el grupo de edad pediátrica. El meduloblastoma es un tumor embrionario del cerebelo que se origina a partir de las células madre de la capa granular externa del cerebelo y de las células madre de la matriz ventricular supendimaria⁴². En la actualidad los tratamientos convencionales suelen ser exitosos. No obstante, los efectos secundarios en los pacientes que sobreviven afectan notablemente su calidad de vida al disminuir su capacidad cognitiva, motriz y auditiva⁴³.

El cáncer es el resultado de la desregulación de la proliferación celular y la migración celular. Las células tumorales se caracterizan por su descontrol en el desarrollo de diversos mecanismos del abandono del sitio primario para llegar a sitios distantes mediante los procesos de diseminación metastásica. Los mecanismos moleculares utilizados por las células cancerosas para adherirse y migrar es un tema central en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, la cascada de eventos que conducen a la migración de las células durante el desarrollo del tumor es poco conocido. Los TLRs se caracterizan por tener la capacidad de desencadenar señales que regulan la expresión de genes implicados en diferentes procesos celulares que promueven o suprimen la progresión del cáncer como la capacidad de migración, de proliferación, metástasis, entre otros^{44,45}.

Se ha reportado la asociación entre el desarrollo y la progresión del tumor y la activación de los TLRs expresados en distintos tipos de cáncer, tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, pese a que existen estudios sobre otros tipos de cáncer, poco se conoce sobre el papel que tienen los TLRs en la migración de las células de meduloblastoma. Esto trae como consecuencia que exista un avance pobre en entendimiento del desarrollo del tumor.

Para investigar los mecanismos implicados en la migración de células de meduloblastoma, Nos centramos en 2 ensayos que miden el potencial migratorio de las células, llevando a cabo ensayos de migración por estría y en cámaras transwell utilizando como estímulos agonistas de TLRs.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la estimulación de los TLRs induce una disminución de la migración de las células de meduloblastoma, sobre todo al estimular a TLR9. Este hallazgo es consistente con estudios previos en los que se reportó que la activación de TLR3 con [poli (I: C)] inducen la supresión de la migración e invasión en células de neuroblastoma⁴⁶ y es de gran importancia ya que generalmente no se identifica a los TLRs como inhibidores del movimiento celular. La migración es un parámetro crítico en la diseminación metastásica de las células cancerosas, siendo la principal causa de

muerte en pacientes con cáncer, por lo que existe la necesidad de nuevas estrategias terapéuticas para evitar la propagación²⁹.

Las células cancerosas sufren cambios moleculares y celulares al remodelar su adhesión célula-célula, célula-matriz y su citoesqueleto de actina, procesos moleculares que involucran la actividad de varias redes de señalización. Los estímulos que promueven la migración celular, tales como citocinas, quimiocinas entre otros, activan las vías que controlan la organización de los complejos de citoesqueleto y adhesión de actina. Existe evidencia reciente que indica que la señalización del factor nuclear NF- κ B es un mediador de la migración e invasión en los cánceres humanos⁴¹. En las células en reposo, la señalización de NF- κ B está bloqueada por I- κ B α en el citosol. Al activarse el complejo cIAP/TRAF I- κ B α se fosforila y se degrada, lo que conduce a la translocación nuclear de las subunidades p65/p50 de NF- κ B y la activación transcripcional de los genes diana de NF- κ B conduciendo a niveles elevados de RNAm implicados en la migración (IL-8, proteína quimioatrayente de monocitos 1, etc)⁴¹ por lo que NF- κ B puede controlar la migración a través de la activación transcripcional de genes pro-migratorios. Sin embargo, aunque en diversas células la activación de los TLRs mejora el crecimiento tumoral, la supervivencia, la metástasis y la inflamación, algunos TLR pueden poseer una función antitumoral como el TLR9 reduciendo la proliferación de las células de glioma humano⁴⁷. Este hallazgo es de gran importancia, ya que la activación de un TLR particular en un tipo de células tumorales tiene un impacto antitumoral, pero puede desempeñar un papel de protumor en otro tipo de tumores.

Existen reportes previos en los que se describen que la estimulación de los TLRs en células cancerígenas activan al factor NF- κ B mediante dinucleótidos citosina-fosfato-guanidina (CpGs) no metilados^{47,48}. En este trabajo demostramos que el ODNB1 induce una disminución de la proteína NF- κ B al activar al TLR9 mediante ligandos sintéticos. Es muy probable que esta disminución sea debido a que se ha reportado que los factores de transcripción como NF- κ B se encuentran activos constitutivamente en diferentes células madre cancerosas⁴⁹.

La vía de señalización de TLRs está estrechamente controlada para evitar respuestas excesivas e incontroladas. En la señalización de TLRs, varios reguladores negativos que funcionan a través de la prevención de la unión ligando-receptor, la degradación de la proteína diana y la inhibición del reclutamiento o la transcripción de los productos intermedios han sido identificados.

La regulación negativa de la señalización de TLR tiene lugar en múltiples pasos, que van desde señuelos de TLR solubles extracelulares hasta inhibidores transmembrana e intracelulares como los que contienen el dominio TIR⁵⁰. La presencia de varios puntos control sugieren que diferentes reguladores pueden actuar en diferentes tipos de tejido o en diferentes momentos. Se conoce por ejemplo, que la molécula relacionada con IL.1R de inmunoglobulina única (SIGIRR)

inhibe la activación de NF- κ B inducida por los receptores que contienen el dominio TIR como TLR e IL-1R1, pero el mecanismo de inhibición aún no está claro⁵¹.

Como se mencionó anteriormente, una vez activado NF- κ B regula una amplia variedad de genes diana, que también incluyen reguladores negativos de la señalización de NF- κ B como A20 que desubiquitina moléculas de señalización específicas de NF- κ B como TRAF6, lo que implica a A20 en la regulación por retroalimentación negativa de la señalización de NF- κ B^{52,53}. Sin embargo, se requieren de otros estudios que nos permitan confirmar esta hipótesis.

En resumen, los resultados obtenidos en el presente estudio muestran por primera vez que los TLR7, TLR8 y TLR9 sugieren tener participación en la migración de las células de meduloblastoma, induciendo aparentemente la supresión del movimiento celular. Además de que la estimulación del TLR9 mediante ODNs B propone disminuir la producción del factor de transcripción NF- κ B. En conjunto estos resultados nos muestran la posible función de los TLRs en la migración del meduloblastoma.

11. CONCLUSIONES

Los receptores TLR7, TLR8 y TLR9 parecen mostrar un papel importante en la regulación de la migración de las células de meduloblastoma.

Los TLRs 7, 8 y 9 sugieren inducir una disminución en la capacidad de migración de las células de meduloblastoma.

Existe una disminución de la expresión del factor de transcripción NF- κ B. Sin embargo, los resultados obtenidos no demuestran que los efectos observados son generados a partir de la estimulación del TLR9, por lo que esta correlación únicamente nos puede dar un indicio de la posible vía de señalización involucrada.

Poco se sabe acerca de la contribución directa de los TLRs durante la migración de las células tumorales *in vitro*. La evidencia, sin embargo, converge para indicar que los receptores TLR7, TLR8 y TLR9 de hecho pueden estar actuando como reguladores positivos o negativos durante el desarrollo del meduloblastoma.

12. PERSPECTIVAS

- Abordar las causas de la inhibición en la capacidad de migración de las células de meduloblastoma una vez estimuladas con agonistas sintéticos analizando las proteínas involucradas en el proceso, tales como e-cadherina.
- Evaluar la caracterización y cuantificación de citocinas producidas como resultado del estímulo de los TLRs con agonistas sintéticos y que podrían estar favoreciendo o disminuyendo la migración celular tales como IL-8, TNF- α e IL-1 β ,
- Evaluar la capacidad de migración de las células de meduloblastoma utilizando un inhibidor de NF- κ B y estimulando a los TLRs 7, 8 y 9.
- Profundizar en el estudio de la migración en las células de meduloblastoma, estudiando el efecto de la estimulación de TLRs *in vivo* en tumores generados en ratones *nu/nu* mediante la inoculación de células de meduloblastoma en el cerebelo.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Northcott, P. A. *et al.* Medulloblastoma. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **5**, 11 (2019).
2. Paulino, A. C. & Carrie, C. Medulloblastoma. *Radiat. Oncol. Pediatr. CNS Tumors* 107–123 (2017) doi:10.1007/978-3-319-55430-3_6.
3. Bailey, P. & Cushing, H. Medulloblastoma cerebelli: A common type of midcerebellar glioma of childhood. *Arch. Neurol. Psychiatry* (1925) doi:10.1001/archneurpsyc.1925.02200140055002.
4. Gerber, N. U. *et al.* Recent developments and current concepts in Medulloblastoma. *Cancer Treat. Rev.* **40**, 356–365 (2014).
5. Rutkowski, S. *et al.* Medulloblastoma in Young Children. 635–637 (2010) doi:10.1002/pbc.
6. Rivera-Luna, R. *et al.* Medulloblastoma en pediatría. Pronóstico y tratamiento en la actualidad. *Gac. Med. Mex.* **143**, 415–420 (2007).
7. Taylor, M. D. *et al.* Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol.* **123**, 465–472 (2012).
8. Hanahan, D. & Coussens, L. M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* vol. 21 309–322 (2012).
9. Gajewski, T. F., Schreiber, H. & Fu, Y. X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature Immunology* vol. 14 1014–1022 (2013).
10. De Rezende, L. C. D., Silva, I. V., Rangel, L. B. A. & Guimarães, M. C. C. Regulatory T Cell as a target for cancer therapy. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. **58**, 179–190 (2010).
11. Balkwill, F., Charles, K. A. & Mantovani, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* (2005) doi:10.1016/j.ccr.2005.02.013.
12. Gieryng, A., Pszczolkowska, D., Walentynowicz, K. A., Rajan, W.

- D. & Kaminska, B. Immune microenvironment of gliomas. *Lab. Investig.* **97**, 498–518 (2017).
13. Urban-Wojciuk, Z. *et al.* The role of tlrs in anti-cancer immunity and tumor rejection. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
 14. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nature Immunology* vol. 11 373–384 (2010).
 15. Rojo-León, V., Aguilar-Cázares, D., Prado-García, H., Carlos-Reyes, Á. & Sullivan López-González, J. *Participación de los patrones moleculares asociados al daño en el tratamiento convencional del cáncer ARTÍCULO DE REVISIÓN Participation of damage-associated molecular patterns in conventional treatment of cancer. Revista de Investigación Clínica* vol. 64 <https://www.medigraphic.com/pdfs/revinvcli/nn-2012/nn123j.pdf> (2012).
 16. Hayashi, F. *et al.* The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**, 1099–1103 (2001).
 17. Hanke, M. L. & Kielian, T. Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clin. Sci. (Lond)*. **121**, 367–87 (2011).
 18. Herrero, M. J. ABC de los «Toll-like receptors»: Relación con el desarrollo y progresión de enfermedades autoinmunes. *Seminarios de la Fundacion Espanola de Reumatologia* vol. 11 135–143 (2010).
 19. Rakoff-Nahoum, S. & Medzhitov, R. Toll-like receptors and cancer. *Nature Reviews Cancer* vol. 9 57–63 (2009).
 20. Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O. & Kolch, W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* vol. 26 3279–3290 (2007).
 21. Honda, K. & Taniguchi, T. IRFs: Master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nature Reviews Immunology* vol. 6 644–658 (2006).
 22. Lin, W. & Karin, M. A cytokine-mediated link between innate immunity , inflammation , and cancer Find the latest version :

- Review series A cytokine-mediated link between innate immunity , inflammation , and cancer. **117**, 1175–1183 (2007).
23. Friedl, P. & Wolf, K. Tumour-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews Cancer* vol. 3 362–374 (2003).
 24. Friedl, P. & Gilmour, D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 10 445–457 (2009).
 25. Kramer, N. *et al.* In vitro cell migration and invasion assays. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* vol. 752 10–24 (2013).
 26. Zena, L. M. C. and. *Nature*. 2002 Dec 19; 420(6917): 860–867. doi: 10.1038/nature01322 PMID: PMC2803035 NIHMSID: NIHMS163568 Inflammation and cancer Lisa M. Coussens*†§ and Zena Werb‡§. *Nature*. (2002).
 27. Karin, M. & Greten, F. R. NF-κB: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 749–759 (2005).
 28. Zavadil, J. & Böttiger, E. P. TGF-β and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* vol. 24 5764–5774 (2005).
 29. Yilmaz, M. & Christofori, G. Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Molecular Cancer Research* vol. 8 629–642 (2010).
 30. He, W. *et al.* TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. *Mol. Immunol.* **44**, 2850–2859 (2007).
 31. Chen, R., Alvero, A. B., Silasi, D. A. & Mor, G. Inflammation, cancer and chemoresistance: Taking advantage of the toll-like receptor signaling pathway. *American Journal of Reproductive Immunology* vol. 57 93–107 (2007).
 32. Philip, M., Rowley, D. A. & Schreiber, H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Semin. Cancer Biol.* **14**, 433–439 (2004).
 33. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN

- estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
34. Li, C., Li, H., Jiang, K., Li, J. & Gai, X. TLR4 signaling pathway in mouse Lewis lung cancer cells promotes the expression of TGF- β 1 and IL-10 and tumor cells migration. *Biomed. Mater. Eng.* **24**, 869–75 (2014).
 35. El Andaloussi, A., Sonabend, A. M., Han, Y. & Lesniak, M. S. Stimulation of TLR9 with CpG ODN enhances apoptosis of glioma and prolongs the survival of mice with experimental brain tumors. *Glia* **54**, 526–535 (2006).
 36. Ruan, M. *et al.* Activation of Toll-like receptor-9 promotes cellular migration via up-regulating MMP-2 expression in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One* **9**, e92748 (2014).
 37. Park, J. H. *et al.* Toll-like receptor 5 activation promotes migration and invasion of salivary gland adenocarcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* **40**, 187–193 (2011).
 38. Buonfiglioli, A. *et al.* let-7 MicroRNAs Regulate Microglial Function and Suppress Glioma Growth through Toll-Like Receptor 7. *Cell Rep.* **29**, 3460-3471.e7 (2019).
 39. Cherfils-Vicini, J. *et al.* Triggering of TLR7 and TLR8 expressed by human lung cancer cells induces cell survival and chemoresistance. *J. Clin. Invest.* **120**, 1285–1297 (2010).
 40. Maslinska, D., Laure-Kamionowska, M. & Maślinska, S. Toll-like receptors as an innate immunity bridge to neuroinflammation in medulloblastoma. *Folia Neuropathol.* **50**, 375–81 (2012).
 41. Tchoghandjian, A., Jennewein, C., Eckhardt, I., Rajalingam, K. & Fulda, S. Identification of non-canonical NF- κ B signaling as a critical mediator of smac mimetic-stimulated migration and invasion of glioblastoma cells. *Cell Death Dis.* **4**, (2013).
 42. Davare, M. A., Saneyoshi, T. & Soderling, T. R. Calmodulin-kinases regulate basal and estrogen stimulated medulloblastoma migration via Rac1. *J. Neurooncol.* **104**, 65–82 (2011).
 43. Huybrechts, S. *et al.* Prognostic clinical and biologic features for overall survival after relapse in childhood medulloblastoma. *Cancers (Basel)*. **13**, 1–19 (2021).

44. Kawasaki, T. & Kawai, T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front. Immunol.* **5**, 461 (2014).
45. Chang, Z. L. Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways. *Inflammation Research* vol. 59 791–808 (2010).
46. Hsu, W. M. *et al.* Toll-like receptor 3 expression inhibits cell invasion and migration and predicts a favorable prognosis in neuroblastoma. *Cancer Lett.* **336**, 338–346 (2013).
47. Li, X. *et al.* CpG ODN107 potentiates radiosensitivity of human glioma cells via TLR9-mediated NF- κ B activation and NO production. *Tumor Biol.* **33**, 1607–1618 (2012).
48. Luo, Y. *et al.* Regulation of migration and invasion by Toll-like receptor-9 signaling network in prostate cancer. *Oncotarget* **6**, 22564–74 (2015).
49. Shostak, K. & Chariot, A. NF- κ B, stem cells and breast cancer: The links get stronger. *Breast Cancer Research* vol. 13 (2011).
50. Troutman, T. D. *et al.* Role for B-cell adapter for PI3K (BCAP) as a signaling adapter linking Toll-like receptors (TLRs) to serine/threonine kinases PI3K/Akt. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 273–278 (2012).
51. Drexler, S. K. *et al.* SIGIRR/TIR-8 is an inhibitor of toll-like receptor signaling in primary human cells and regulates inflammation in models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **62**, 2249–2261 (2010).
52. Kramer, N. *et al.* In vitro cell migration and invasion assays. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* **752**, 10–24 (2013).
53. Guven-Maiorov, E., Keskin, O., Gursoy, A. & Nussinov, R. A Structural View of Negative Regulation of the Toll-like Receptor-Mediated Inflammatory Pathway. *Biophys. J.* **109**, 1214–1226 (2015).