



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES

QUÍMICO BIOLÓGICAS

**“Expresión de los receptores tipo Toll producida
por los ciclodipéptidos de *Pseudomonas
aeruginosa* PAO1 sobre las células cancerosas
HeLa v K562”**

T E S I S

Para obtener el título de

Maestro en Ciencias en Biología Experimental

Presenta:

I.B.Q. Michelle Ashanty Díaz Pérez

Director de Tesis:

D.C. Homero Reyes De La Cruz

Codirector de Tesis:

D.C. Jesús Campos García

Morelia, Michoacán

Marzo, 2023

AGRADECIMIENTOS

Al D.C. Homero Reyes y al D.C Jesús Campos

Por haberme brindado la confianza de desarrollar este proyecto apoyándome con sus conocimientos y su tiempo.

A mi hijo, Santi

Por ser mi mayor motivación y mi todo en la vida

A mis padres y a mi hermana

Gracias por siempre estar cuando más los necesito y confiar en que soy capaz de hacer lo que me propongo.

A Luis Carlos

Por tu apoyo incondicional y estar pendiente siempre de Santiago

A Lore

Gracias por siempre despejar mis dudas, por tu paciencia, risas y tiempo. También por esos regaños después de cada seminario y recordarme que era tu bendi y no podía decepcionarte.

CONTENIDO

1. RESUMEN	5
ABSTRACT	6
2. INTRODUCCIÓN	7
2.1 Antecedentes	7
2.1.1 El cáncer.....	7
2.1.2 Tipos de cáncer	9
2.1.2.1 Leucemia	9
2.1.2.1.1 Leucemia mieloide crónica.....	9
2.1.2.2 Cáncer cervicouterino	10
2.1.3 El cáncer y la respuesta inmunológica.....	10
2.1.4 Inflamación y cáncer	11
2.1.5 Receptores tipo Toll (TLR)	12
2.1.5.1 Vías de transducción de señales de TLR.....	13
2.1.5.2 TLR y tumores	15
2.1.5.3 Actividad antitumoral de los TLRs.....	16
2.1.6 Citocinas en la patogénesis y la terapia del cáncer.....	17
2.1.7 Compuestos bacterianos en el desarrollo de las terapias contra el cáncer	18
2.1.8 Ciclodipéptidos	18
2.1.8.1 Actividad citotóxica de los ciclodipéptidos aislados en células cancerosas ...	20
2.2 Justificación.....	21
2.3 Hipótesis	21
2.4 Objetivos	22
2.4.1 Objetivo general.....	22
2.4.2 Objetivos específicos	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1 Medios de cultivo.....	22
3.2 Líneas celulares	23
3.3 Crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	23
3.4 Extracción de ciclodipéptidos	23
3.5 Cultivo celular.....	24
3.6 Tratamiento con los ciclodipéptidos (CDP)	24
3.7 Lisis celular	24
3.8 Geles desnaturizantes SDS-PAGE	25
3.9 Western Blot.....	25
3.9.1 Transferencia de proteínas.....	25
3.9.2 Inmuno-detección	26

3.10 Determinación de citocinas.....	26
4. RESULTADOS	27
4.1 Los CDP de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 estimulan la expresión de TLR2 y TLR10 en la línea celular K562.	27
3.2 Los CDP de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 no modifican la expresión de TLR4 en la línea celular HeLa	32
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	38
5. CONCLUSIONES.....	40
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general de los receptores tipo Toll (Vadillo & Pelayo, 2012).....	13
Figura 2. Vía de señalización de TLR. (Noh et al., 2020)	14
Figura 3. Estructura general de los ciclodipéptidos o 2,5-dicetopiperazinas. (Borthwick, 2012).....	19
Figura 4. Expresión de TLR4 por CDP de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en la línea celular K562..	28
Figura 5. Expresión de TLR2 en la línea celular K562 con tratamientos de CDP de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	28
Figura 6. Expresión de TLR10 en la línea celular K562 con tratamientos de CDP de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	29
Figura 7. Expresión de la proteína MyD88 en la línea celular K562	29
Figura 8. Expresión de la proteína $\text{ikB}\alpha$ en la línea celular K562.....	30
Figura 9. Expresión de NF- kB en la línea celular K562	31
Figura 10. Expresión de la proteína $\text{ikB}\alpha$ fosforilada en la línea celular K562.	31
Figura 11. Expresión de TLR4 por CDPs de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en la línea celular HeLa.	32
Figura 12. Expresión de TLR2 por CDP de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en la línea celular HeLa.	33
Figura 13. Expresión de TLR10 en la línea celular HeLa	33
Figura 14. Expresión de la proteína adaptadora MyD88 en HeLa	34
Figura 15. Expresión de la proteína $\text{ikB}\alpha$ en la línea celular HeLa.	34
Figura 16. Expresión de la proteína p- $\text{ikB}\alpha$ en la línea celular HeLa.....	35
Figura 17. Expresión de la proteína NF- kB en la línea celular HeLa	35
Figura 18. Expresión de TNF- α en la línea celular HeLa.....	35
Figura 19. Expresión de IL-6 en las líneas celulares HeLa y K562.....	35
Figura 20. Expresión de IL-10 en las líneas celular HeLa y K562.....	35
Figura 21. Vías de señalización con tratamientos de CDP en línea celular K562 y HeLa..	39

1. RESUMEN

El cáncer es una de las principales patologías que afectan a la población a nivel mundial. Existe una estrecha relación entre el sistema inmunológico y el desarrollo del cáncer. La respuesta inmunológica tiene el potencial de destruir específicamente células tumorales, sin dañar el tejido sano del cuerpo y de crear una memoria inmune a largo plazo capaz de prevenir recurrencias. La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa del organismo, la respuesta primaria a patógenos en el sistema inmunitario innato está mediada por receptores tipo Toll (TLR). Cuando los TLR reconocen ligandos transducen señales que culminan mayormente en la producción de citocinas que alertan a las células del sistema inmunológico para la eliminación de células dañadas o células muertas. Los ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 muestran efectos citotóxicos en las líneas celulares Caco-2, HeLa y F0. En este trabajo se muestra la participación de los receptores tipo toll producidos por los CDPs en las líneas celulares HeLa y K562, obteniendo que TLR2 y TLR10 se expresan así como las proteínas involucradas en esta vía, MyD88, $\text{I}\kappa\text{B}$ fosforilada y NF- κB ; por otro lado en la línea celular HeLa los TLRs que se evaluaron no se expresaban, en cambio NF- κB sí se expresa, relacionando así una posible activación por la vía de PI3K/AKT descubierta anteriormente por nuestro equipo de trabajo. Así mismo, las citocinas evaluadas en este trabajo IL-6, IL-10 y TNF- α no presentaron ningún cambio con los tratamientos de CDPs. Se concluyó en este proyecto que los CDPs activan la vía de señalización de TLR en la línea celular K562.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, cáncer, TLR, ciclodipéptidos.

ABSTRACT

Cancer is one of the main pathologies that affect the population worldwide. There is a close relationship between the immune system and the development of cancer. The immune response has the potential to specifically destroy tumor cells, without harming the body's healthy tissue, and to create a long-term immune memory capable of preventing recurrences. Innate immunity is the body's first line of defense, the primary response to pathogens in the innate immune system is mediated by Toll-like receptors (TLRs). When TLRs recognize ligands, they transduce signals that culminate mostly in the production of cytokines that alert the cells of the immune system for the elimination of damaged cells or dead cells. Cyclodipeptides produced by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 show cytotoxic effects on Caco-2, HeLa and F0 cell lines. This work shows the participation of toll-like receptors produced by PDCs in HeLa and K562 cell lines, obtaining that TLR2 and TLR10 are expressed as well as the proteins involved in this pathway, MyD88, phosphorylated $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ and NF- κB ; On the other hand, in the HeLa cell line, the TLRs that were evaluated were not expressed, whereas NF- κB is expressed, thus relating a possible activation by the PI3K/AKT pathway previously discovered by our work team. Likewise, the cytokines evaluated in this work IL-6, IL-10 and TNF- α did not show any change with the CDPs treatments. It was concluded in this project that CDPs activate the TLR signaling pathway in the K562 cell line.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, cancer, TLR, cyclodipeptides

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Antecedentes

2.1.1 El cáncer

El cáncer es una de las principales patologías que afectan a la población a nivel mundial (World Health Organization, 2013). Actualmente, es considerado como un desorden de células que se dividen anormalmente, lo que conduce a la formación de agregados que crecen dañando tejidos vecinos, se nutren del organismo y alteran su fisiología. Además, estas células pueden migrar e invadir tejidos lejanos, donde encuentran un nicho apropiado para continuar su crecimiento originando una metástasis (Mitrus *et al.*, 2012).

El término “cáncer” se puede clasificar de acuerdo con el tejido y tipo de célula a partir del cual se originan (Alberts *et al.*, 2006).

En el primer grupo de la clasificación se encuentran las leucemias y linfomas que incorporan a los cánceres de tejidos formadores de células sanguíneas. Provocan invasión del bazo y médula ósea, inflamación de ganglios linfáticos y producción excesiva de leucocitos inmaduros. El grupo dos lo conforman los sarcomas que proceden del tejido conectivo como el hueso, cartílago, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo. El tercer grupo son los carcinomas, que proceden de tejidos epiteliales y los tejidos glandulares (Gao *et al.*, 2017).

A pesar de las diversas entidades clínicas agrupadas como cáncer, es posible identificar ciertas características comunes de las células tumorales que permiten el desarrollo de nuevas estrategias clínicas comunes para su manejo (Hanahan & Weinberg, 2011). Existen diez características que son compartidas por las células tumorales:

1. Independencia de señales de crecimiento,
2. Insensibilidad a estímulos que inhiben el crecimiento,
3. Invasividad y metástasis,
4. Evasión de apoptosis,
5. Potencial ilimitado de replicación.

6. Angiogénesis sostenida.
7. Reprogramación del metabolismo energético
8. Evasión de la destrucción inmunológica
9. Desregulación energética celular
10. Mutación e inestabilidad genómica (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011).

Estas características son adquiridas en los diversos tipos celulares por distintos mecanismos y eventos durante el proceso carcinogénico. Su desarrollo se ve favorecido por la inestabilidad genómica y la inflamación las fomenta (Hanahan & Weinberg, 2011).

Se ha avanzado potencialmente en el conocimiento del cáncer y algunos de los factores etiológicos que lo predisponen. Por ejemplo, se sabe que la interacción de factores génicos y estímulos ambientales provoca alteraciones en el interior de las células, que frecuentemente llevan a una proliferación celular anormal. Para eliminar estas aberraciones, el sistema inmunológico posee diversos mecanismos (vigilancia inmunológica) que incluyen el sistema innato y adaptativo los cuales reconocen y eliminan las células transformadas.

Las células tumorales son reconocidas por las células inmunes dado que expresan un patrón proteico distinto al expresado por células normales por la causa de mutaciones, infecciones por virus oncogénicos o por desregulación de su crecimiento. El reconocimiento de las células tumorales es complejo, ya que por ser células del mismo individuo, existe cierto grado de inmunotolerancia. Algunas células tumorales logran escapar de la eliminación y entran a una fase de equilibrio, en las que son mantenidas por el sistema inmunológico adaptativo, hasta que emergen clones que no son reconocidos, escapan del control y continúan proliferando hasta el desarrollo del tumor.

Por esta razón, en los últimos años las investigaciones se han enfocado al estudio y comprensión de los mecanismos inmunológicos capaces de reconocer y destruir las células tumorales (Barrera-Rodríguez *et al.*, 1995).

2.1.2 Tipos de cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte en muchos países. Según reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2018 se reportaron cerca 190,667 nuevos casos en el país. Los cinco tipos de cáncer con mayor incidencia en México, son: de mama, próstata, tiroides, colon y cervicouterino (GLOBOCAN, 2018).

De acuerdo al estado del tumor el cáncer se puede clasificar en tumores líquidos o sólidos.

Los tumores sólidos son los que tiene un mayor porcentaje de incidencia alrededor de un 80%. Según el Instituto Nacional de Cáncer, un tumor sólido se puede definir como “masa anormal de tejido”, estos tumores sólidos pueden ser benignos (no cancerosos) o malignos (cancerosos). Este tipo de tumores reciben su nombre por el tipo de células que los forman como lo son los sarcomas, carcinomas y los linfomas. En cambio, los tumores líquidos no forman tumores y se da en el torrente sanguíneo como lo es la leucemia (Jain *et al.*, 2011).

2.1.2.1 Leucemia

La palabra leucemia proviene del griego *leuco* que significa *blanca* y *hemo*, que significa sangre. Consiste en la carencia de control sobre crecimiento, proliferación, así como la función fallida de los leucocitos, las cuales son la primer barrera del sistema inmunológico (Hanahan & Weinberg, 2011). Con base en sus características clínicas y celulares pueden ser clasificadas de acuerdo a la población celular (*linaje mieloide y linfoide*) y su agresividad (*aguda y crónica*) (Tefferi & Vardiman, 2008).

2.1.2.1.1 Leucemia mieloide crónica

La leucemia mieloide crónica o CML (Chronic Myeloid Leukemia) es un desorden mieloproliferativo que se caracteriza por un aumento predominante y desregulado de estadios diferenciados, afectando a la serie eritroide y granulocítica (Baccarani *et al.*, 2012). Este tipo de leucemia se diagnostica frecuentemente en la edad adulta (Shanafelt, 2013). Se clasifica en dos fases de forma clínica: fase inicial o fase crónica, en la que la sobreproducción de granulocitos es fácil de controlar y

el paciente tiene mejor pronóstico. Por otra parte, está la fase aguda o blástica en la cual el enfermo tiene una mayor resistencia al tratamiento y peor pronosis (Fabbro, 2012).

La patogénesis de la leucemia mieloide crónica se basa en una anormalidad cromosomal asociada a la translocación recíproca entre un fragmente del cromosoma 22, constituido por un segmento del gen BCR (Breakpoint Cluster Region) y el segmento del proto-oncogén ABL del cromosoma 9 (Deininger *et al.*, 2000; Maru, 2012).

2.1.2.2 Cáncer cervicouterino

Es el segundo tipo de cáncer más frecuente en la mujer, es una alteración celular que se origina en el epitelio del cuello del útero, el cual inicialmente se manifiesta por lesiones precursoras de lenta y progresiva evolución, que pueden seguir las etapas de displasia leve, moderada y severa (López & Lizano, 2006).

Existen varios factores de riesgo entre los cuales se encuentran la presencia de virus del papiloma humano (VPH), múltiples parejas sexuales, actividad sexual a temprana edad, tener historial de otras enfermedades de transmisión sexual, tabaquismo y el uso prolongado de anticonceptivos hormonales (Tirado-Gómez *et al.*, 2005).

2.1.3 El cáncer y la respuesta inmunológica.

Existe una estrecha relación entre el sistema inmunológico y el desarrollo del cáncer. La respuesta inmunológica tiene el potencial de destruir específicamente células tumorales, sin dañar el tejido sano del cuerpo y de crear una memoria inmune a largo plazo capaz de prevenir recurrencias (Finn, 2012). El sistema inmunológico tiene por un lado la capacidad de detectar y eliminar células tumorales y por el otro, puede proveer un microambiente favorable para el crecimiento tumoral. Debido a la función dual de algunas citocinas y moléculas del sistema inmunológico, aún no se ha podido distinguir con claridad la inmunidad inflamatoria promotora de tumores de la inmunidad supresora de tumores (Chow *et al.*, 2012). La inflamación crónica en el microambiente tumoral y la capacidad del tumor para evadir la

respuesta inmune son factores condicionantes para la oncogénesis (Berraondo *et al.*, 2016).

El papel que desempeña el sistema inmune en el control de tumores fue propuesto inicialmente por Thomas y Burnet en 1957, con la teoría de la "vigilancia inmunológica". Esta teoría postula que, dentro de un organismo, continuamente se están generando células malignas, pero que éstas son identificadas y destruidas rápidamente por el sistema inmune. La vigilancia inmunológica ha sido comprobada en varios modelos experimentales, ejemplificados por crecimiento exitoso de xenotransplantes (incluyendo tumores humanos) en ratones desnudos (nu/nu) y por el incremento en la aparición de tumores en animales timectomizados y en humanos que presentan inmunosupresión (Grossman & Herberman, 1986).

Para que se produzca una respuesta inmune celular eficiente contra tumores, se requiere que: a) los determinantes antigénicos sean expresados por las células tumorales; b) los antígenos sean eficientemente presentados por las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CPH); c) el reconocimiento a estos antígenos estimule la respuesta de los linfocitos T (CD4+ y CD8+), linfocitos B y macrófagos; y, d) las células efectoras sean capaces de llegar al sitio de localización del tumor y causar la destrucción del mismo. Para que los primeros pasos puedan realizarse, es necesaria la participación de varios tipos de moléculas, como son las del CPH, el receptor para antígenos de célula T (RcT), las moléculas de adhesión y antígenos tumorales (Barrera-Rodríguez *et al.*, 1995).

2.1.4 Inflamación y cáncer

La inflamación es un proceso que implica la activación, incorporación y la actuación de células de la respuesta inmunológica innata y adaptativa (Medzhitov, 2008) para la destrucción de microbios y tejidos del huésped. Una reacción inflamatoria, en condiciones normales, se autolimita a través de la disminución de factores proinflamatorios acompañado del incremento factores antiinflamatorios. Las células inmunológicas sufren apoptosis y son fagocitadas. La inflamación es el inicio del desarrollo de cáncer y promueve la tumorigénesis (Zilionis *et al.*, 2019).

La respuesta inflamatoria conlleva 4 etapas, la primera es el reconocimiento de la infección, seguido del reclutamiento de células al sitio de la infección, después la eliminación del microorganismo y resolución de la inflamación para así llegar de nuevo a la homeostasis (Barton, 2008).

El proceso de inflamación inicia con el reconocimiento de ligandos por células del sistema inmunológico innato acompañados de receptores de patrones de reconocimiento (PRR). Los más importantes son los receptores tipo toll (TLR) y los NOD (dominio de oligomerización de unión a nucleótidos) (Mariathasan & Monack, 2007).

La activación del sistema inmunológico en el tumor es una de las inmunoterapias actuales, ya que en algunos casos, la liberación de patrones moleculares asociados al daño (DAMP), como lo son ATP (Adenosín trifosfato) y HMGB-1 (“High Mobility Group Box 1”), de células tumorales puede estimular la producción de citocinas para poder conducir a la inmunosupresión (Greten & Grivennikov, 2019).

2.1.5 Receptores tipo Toll (TLR)

Los receptores tipo toll (TLR, por sus siglas en inglés) son receptores que actúan como la primera línea de defensa contra los microbios, se han identificado 10 tipos en humanos y 13 tipos de TLR en ratones (Urban-Wojciuk et al., 2019), encontrándose la mayoría de ellos ampliamente distribuidos en diferentes tipos celulares del sistema inmune, incluyendo células dendríticas, macrófagos, células «natural killer» (NK), mastocitos, neutrófilos y linfocitos T y B. Se encuentran además en células no relacionadas con el sistema inmune como son los fibroblastos, células epiteliales y queratinocitos (Manicassamy & Pulendran, 2009). La mayoría de estos receptores se expresan en la superficie celular (TLR1, 2, 4, 5, 6, 10 y 11) mientras que una minoría se encuentran presentes en compartimentos endosomales (TLR3, 7, 8 y 9). Los TLR se pueden expresar como homodímeros o como heterodímeros (Herrero & Pérez-Simón, 2010).

Los TLR pueden reconocer a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y a patrones moleculares asociados a daño (DAMP) (Y. Zhang & Liang, 2016), los ligandos para TLR son amplios, van desde ácidos nucleicos hidrófilos hasta lípidos hidrófobos y desde compuestos de pequeño tamaño hasta macromoléculas (Wu *et al.*, 2016).

Los TLR son proteínas transmembranales de tipo I que contiene entre 19 y 25 repeticiones extracelulares ricas en leucina (LRR) para el reconocimiento de PAMP o DAMPS y dominios intracelulares del receptor de interleucina 1 (TIR) para activar la transducción de señales río abajo (Gao *et al.*, 2017).

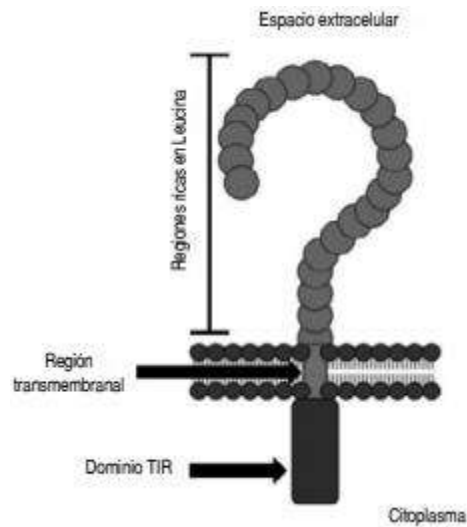


Figura 1. Estructura general de los receptores tipo Toll (Vadillo & Pelayo, 2012).

2.1.5.1 Vías de transducción de señales de TLR

La señalización de TLR se transducen mediante proteínas adaptadoras como MyD88 (respuesta primaria de diferenciación mieloide 88) y TRIF (interferón- β inductor de adaptador que contiene el dominio TIR). La señalización de estas proteínas adaptadoras conduce a la expresión de citocinas como interleucina-1 beta (IL-1 β), factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), mediante la activación de los factores transcripcionales NF- κ B, AP-1 (proteína activadora 1) e IRF-3 (factor regulador de interferón 3) (Piras & Selvarajoo, 2014). Todos los TLR,

omitiendo TLR3, transducen señales mediante MyD88, mientras que TLR3 emite señales mediante TRIF (So & Ouchi, 2010). Hasta ahora, TLR4 es el único capaz de activar ambas cascadas (Ruyschaert & Loney, 2015).

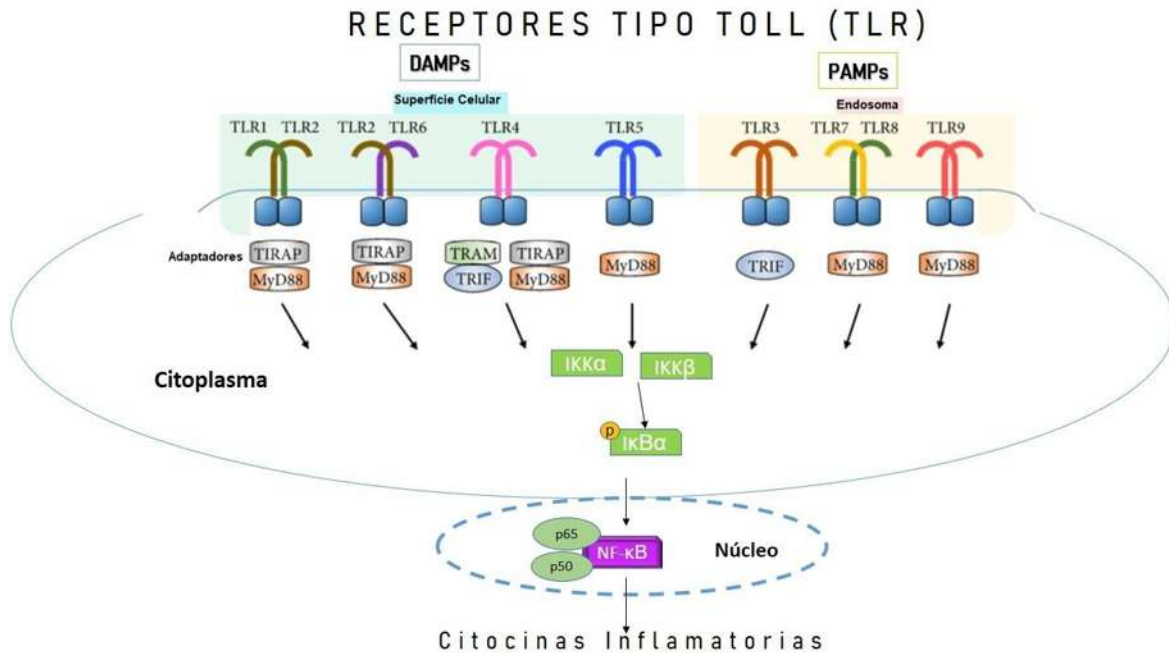


Figura 2. Vía de señalización de TLR. (Noh et al., 2020)

Tras la unión del ligando al receptor tipo toll, este recluta a TIRAP, el cual está en membrana ya que posee dominios de unión a fosfatidilinositoles (Ve et al., 2015). MyD88 interacciona con su dominio *death* con IRAK4 (serin/treoinin quinasa), este dominio es responsable de la agregación de IRAK2 o IRAK1 (Lee, 2013). La ubiquitina K63 es reconocida por los dominios dedos de Zinc del complejo que está compuesto por TAK1, TAB2 y TAB3 y esto desencadena la señalización de NF- κ B y MAPKs (O'Neill, 2008). El complejo TAK/TAB desempeña la activación por fosforilación al complejo IKK, compuesto por IKK α , IKK β e IKK γ (NEMO) que media la fosforilación de la proteína I κ B, liberando así el factor de transcripción NF- κ B (Li & Qin, 2005).

Por otra parte, el complejo TAK1 también controla la activación de las MAPK p38 y JNK, que activarán factores de transcripción como AP-1 que activa la expresión de IFN tipo 1 (Kawai & Akira, 2006).

La señalización vía TRIF activa los factores de transcripción NF- κ B e IRF3 que lleva la expresión de citocinas proinflamatorias e interferones de tipo 1. TRIF se encarga de reclutar tanto a TRAF6, su función es de la misma forma que en la señalización dependiente de MyD88 (Kawai & Akira, 2010). TRIF también es capaz de reclutar a TRAF3, que se poliautoubiquitina en K63 (Kawai & Akira, 2010). Esta poliubiquitinación es reconocida por un complejo que se encarga de fosforilar al factor de transcripción IRF3 y así poder expresar a IFN- α e IFN- β (Li & Qin, 2005).

Tras reconocer el ligando con las proteínas adaptadoras, los TLR experimentan cambios conformacionales, lo que induce a interactuar con el dominio TIR y MyD88, después de esto hace que el complejo inhibidor de la quinasa κ B (IKK) estimule la actividad de NF- κ B y varias proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) para desencadenar c-Jun N-terminal quinasa (JNK), proteína 38 (p38) y quinasa regulada por señal extracelular (ERK), que activa un factor de transcripción llamada proteína activada 1 (AP-1) (Javaid & Choi, 2020). NF- κ B desempeña varias funciones al regular la transcripción, la apoptosis y la proliferación celular, induce genes que participan en diversas funciones como la inflamación, las respuestas inmunitarias y el crecimiento (Aggarwal, 2004).

2.1.5.2 TLR y tumores

La expresión de TLR conduce a la progresión del tumor, mejorando la inmunidad contra el cáncer y las proteínas en la vía de señalización de TLR se consideran objetivos importantes para la terapia contra el cáncer (Wolska *et al.*, 2009). En algunas ocasiones los antígenos tumorales son tolerantes en pacientes con cáncer, es importante que la terapia contra el cáncer disipe una respuesta inmunológica eficiente de las células presentadoras de antígenos (APC), como las células dendríticas (He *et al.*, 2007).

Los TLR se expresan en células presentadoras de antígenos, como macrófagos y células dendríticas, así como en los fibroblastos y en las células

epiteliales, y su función primordial es defender al huésped de una infección microbiana (Kawasaki & Kawai, 2014). No obstante, los TLR también están presentes en las células cancerosas y su expresión a menudo se correlaciona con el pronóstico de la enfermedad. En el cáncer de pulmón se encuentra TLR4, TLR5, TLR7, TLR8 y TLR9. Aquí el TLR5 se asocia a un buen pronóstico, en cambio TLR7 arroja un mal resultado clínico (Gu *et al.*, 2018). Otro caso, es en el melanoma, la alta expresión de TLR7 y TLR8 se asocia con una alta expresión de marcadores de células del sistema inmunológico y predice una supervivencia general más prolongada (M. Zhang *et al.*, 2017). La expresión de TLR9 mejora la angiogénesis, que está relacionada con menores tasas de supervivencia de los pacientes con cáncer de pulmón (Belmont *et al.*, 2014).

El mismo receptor se puede asociar con un pronóstico bueno o malo, como el caso del TLR9, o se puede correlacionar con un mal resultado (como el TLR4). Es por ello que este tipo de receptores son difíciles de estudiar y se sugiere realizar una mejor investigación de receptores individuales en diferentes tipos de cáncer para un mejor enfoque. La expresión de TLR3 en el cáncer de mama elevó la supervivencia del tumor (Salaun *et al.*, 2006), además en el cáncer de próstata tuvo la función de crecimiento y supervivencia del tumor a través de la vía PI3K/AKT (Harashima *et al.*, 2012).

2.1.5.3 Actividad antitumoral de los TLRs

Se ha demostrado que varios ligandos de TLR tienen un efecto antitumoral en diferentes tipos de cáncer. Por ejemplo TLR2 y TLR4 con su ligando derivado sintético del lípido A (OM-174) en melanoma se observó que redujo la progresión tumoral prolongando la supervivencia del tumor especialmente en combinación con ciclofosfamida (D'Agostini *et al.*, 2005). Algunos ligandos han demostrado que pueden ser eficaces como monoterapia, ocasionalmente se administran en un tratamiento combinado, desempeñando el papel de adyuvantes de vacunas (Awasthi, 2014).

Así mismo, la activación de la inmunidad contra el cáncer debería conducir a la erradicación eficiente de las células tumorales haciendo esto el objetivo de muchas terapias contra el cáncer.

2.1.6 Citocinas en la patogénesis y la terapia del cáncer

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular liberadas por las células y su función es la comunicación entre ellas. Pueden actuar sobre las células que las secretan (acción autocrina), sobre las células cercanas (acción paracrina) o, en algunos casos, sobre las células distantes (acción endocrina) (J.-M. Zhang & An, 2007). La activación de TLR conlleva a la producción de citocinas pro y antiinflamatorias, interferones tipo 1 y quimiocinas.

Las citocinas se liberan en respuesta a estrés celular, inducido por carcinógenos, infección e inflamación. Estas proteínas funcionan para estimular una respuesta del huésped que son dirigidas a controlar el estrés celular y minimizar el daño celular. Las reacciones al estrés celular pueden impactar en varias etapas de la formación y progresión del cáncer (Dranoff, 2004).

Por otro lado, la inflamación crónica no resuelta provoca recambio celular y en este proceso, la producción desregulada de citocinas y señalización aberrante de citocinas pueden conducir a crecimiento celular alterado, diferenciación y apoptosis (Wicht & Preisig, 1990). Con estos descubrimientos de la actividad de las citocinas, las células cancerígenas se apoyan de las células inmunológicas y citocinas para favorecer el desarrollo y la progresión del cáncer.

Las citocinas han constituido una estrategia para terapia contra el cáncer, por ejemplo, la interleucina 1 (IL-2) se ha observado que mejora la función de las células natural killer (NK) y las células T CD8 aumenta la permeabilidad vascular (Rosenberg et al., 1993); la interleucina 10 (IL-10) inhibe la presentación de antígenos tumorales (Qin et al., 1997); el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) induce la apoptosis de las células tumorales, activa el endotelio y los granulocitos (Tracey & Cerami, 1994); la interleucina 6 (IL-6) mejora la función de las células T y

B, inhibición sistemáticas (Nishimoto et al., 2000); entre otras citocinas usadas como terapia contra el cáncer.

2.1.7 Compuestos bacterianos en el desarrollo de las terapias contra el cáncer

El cáncer es una de las causas más comunes de muerte, como opciones de tratamiento para esta enfermedad incluyen la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia y la terapia biológica. Sin embargo, a menudo surge a la resistencia eficacia de la quimioterapia y la radioterapia, lo cual conduce a efectos secundarios durante o después del tratamiento (Datta et al., 2015). Las terapias alternativas como la terapia biológica se han propuesto para mejorar y aumentar la eficacia de la terapia común contra el cáncer (Patyar et al., 2010).

Un enfoque que logra superar a las limitaciones de la terapia convencional es el uso de bacterias, ya que por sí solas pueden actuar como agentes antitumorales, además tienen la capacidad para modificarse genéticamente para alterar su capacidad de sintetizar y liberar compuestos específicos (Nuyts *et al.*, 2001). Un ejemplo lo desarrolló Furumoto *et al.*, en el 2004, al informar que los compuestos derivados de bacterias (oligonucleótidos CpG) se pueden usar para activar las células dendríticas y causar la regresión completa de los tumores de melanoma B16-F10, la cual se sabe que son altamente inmunosupresores en ratones.

La inmunoterapia contra el cáncer puede liberar componentes de la respuesta inmunológica específica en los pacientes para permitir que varios tipos de células del sistema inmunológico del huésped ataquen las células cancerosas

2.1.8 Ciclodipéptidos

Los ciclodipéptidos (CDP) son dicetopiperazinas (DKP) cicladas conformadas por dos aminoácidos unidos por dos enlaces peptídicos (Vázquez-Rivera *et al.*, 2015), son producidos por diversos organismos como bacterias, hongos y animales. Los CDP han demostrado un gran potencial para ser usados

como antioxidantes, agentes anti fúngicos, inmunomoduladores y anticancerígenos (Begum Ahil *et al.*, 2019).

El anillo de la molécula de CDP se compone de 6 miembros, los cuales orientan sus sustituyentes de manera espacial definida, por lo que sus características estructurales estables representan un importante farmacóforo en la química medicinal. Además, conociendo su simplicidad estructural y su libertad conformacional, las DKP han sido ampliamente utilizadas como modelos de estudios conformacionales (ejemplo, *cis*, *trans*, isomerismo), reportándose amplias configuraciones relativas de los residuos aminoacídicos ((Budesinsky *et al.*, 2010; Ressurreição *et al.*, 2011)

Los ciclodipéptidos (Figura 3) son abundantes en la naturaleza ya que están presentes en muchos metabolitos secundarios. Desde el punto de vista biológico, éstos pequeños componentes son capaces de unirse a un amplio rango de receptores (Mollica, *et al.*, 2014). Los CDP son ampliamente obtenidos por extracción de fuentes naturales, éstos pueden ser fácilmente sintetizados, debido a su simplicidad estructural (Prasad, *et al.*, 1995).

La mayoría de las reacciones que forman el enlace peptídico en organismos son llevadas a cabo por el ribosoma. Aunque se han reportado otras enzimas que se encargan de la formación de enlaces peptídicos, las cuales son una familia de enzimas formadoras de enlaces peptídicos dependientes de los RNAs de transferencia (RNAt) llamadas ciclodipéptido sintetetas/sintasas no ribosomales (CDPS-NR); así como también por una familia de enzimas formadoras de enlace peptídico conocidas como ciclodipéptido sintetasas no dependientes de ATP (CDPS) (Finking & Marahiel, 2004; Gondry *et al.*, 2009)

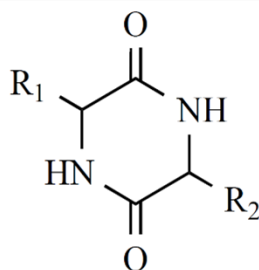


Figura 3. Estructura general de los ciclodipéptidos o 2,5-dicetopiperazinas. (Borthwick, 2012)

2.1.8.1 Actividad citotóxica de los ciclodipéptidos aislados en células cancerosas

Los CDP han demostrado potencial para ser usado como agentes anti-inflamatorios. El Ciclo (L-His-L-Pro) ha mostrado protección en contra de la neuroinflamación mediante las vías de modulación de NF- κ B y Nrf2 (Li *et al.*, 2001). Una composición de CDP demostró la prevención de inflamación intestinal (Gondry *et al.*, 2009). Los CDP derivados de *Streptomyces* han regulado citocinas pro-inflamatorias (TNF- α y IL-6) en modelos *in vivo* e *in vitro*. Aislados de *Achromobacter* han demostrado potencial anti-inflamatorio por la producción de citocinas IL-10 y IL-4. En 2019, Ahil *et al.* con CDP basados en L-Prolina de *Pseudomonas sp.* (ABS-36) inhibieron las citocinas pro-inflamatorias aliviando la lesión renal en modelos de ratones con nefropatía (Begum Ahil *et al.*, 2019).

Ciclo (Val-Pro), ciclo (Gly-Phe), ciclo (Phe-Tyr), ciclo (Leu-Tir) y ciclo (Val-Leu) aisladas de *Streptomyces kunmingensis* han manifestado acción citotóxica en la línea celular MCF-7 (Wei *et al.*, 2017). Ciclo (Pro-Tyr), ciclo (Val-Pro) y ciclo (Pro-Met) derivado de *Pseudomonas aurantiaca* ha exhibido propiedades antifúngicas (Mehnaz *et al.*, 2013). CDP provenientes de *Actinomycetes* tienen propiedades antitumorales (De-hai *et al.*, 2005)

En una investigación se demostró que el Ciclo (Phe-Pro) inhibe el crecimiento de la línea celular HT-29, MCF-7 y HeLa, además demostraron que la muerte celular por apoptosis inducida en células HT-29 de cáncer colon inhibe potencialmente el crecimiento de tumores *in vivo* (Brauns *et al.*, 2004). Ciclo (D-Tyr- D-Phe) induce muerte celular mediante la activación de caspasa 3 en la línea celular A549 de adenocarcinoma pulmonar (Nishanth Kumar *et al.*, 2014).

En el 2015, Vázquez-Rivera *et al.*, demostraron que una mezcla cruda de CDP aislados de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PAO1 muestra efectos citotóxicos en las líneas celulares HeLa y Caco-2.

Hernández-Padilla *et al.* en el 2017, demostró la participación de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR en el mecanismo de inducción de apoptosis por los

CDP segregados por *P. aeruginosa* PAO1 mediante la modulación de la fosforilación de las proteínas cinasas Akt (Ser 473) y S6K (Thr 389). La mezcla de CDP de PAO1 disminuye la formación y el tamaño del tumor en un modelo de melanoma en ratones de la cepa C57BL/6; análisis de sangre de los roedores indicaron que el tratamiento con CDP promueve un incremento en el número de células del sistema inmunológico adaptativo (Durán-Maldonado et al., 2020). Además se demostró que los CDP en la línea celular HeLa bloquean la activación de vías de señalización asociadas en el comienzo de la tumorigénesis (Hernández-Padilla et al., 2020).

2.2 Justificación

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa del organismo, la respuesta primaria a patógenos en el sistema inmunitario innato está mediada por receptores tipo Toll (TLR), Cuando los TLR reconocen ligandos transducen señales que culminan mayormente en la producción de citocinas que alertan a las células del sistema inmunológico para la eliminación de células dañadas o células muertas. Los ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 muestran efectos citotóxicos en las líneas celulares Caco-2, HeLa y F0. Dada la estrecha relación entre el sistema inmunológico y el desarrollo del cáncer por lo que es necesario evaluar el efecto de los CDP de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 sobre la vía de señalización de los TLR en las células cancerosas HeLa y K562.

2.3 Hipótesis

Los ciclodipéptidos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 participan en la activación de los receptores tipo Toll para producir citocinas en las líneas celulares HeLa y K562.

2.4 Objetivos

2.4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de los ciclodipéptidos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 sobre la vía de los receptores tipo Toll de la respuesta inmunológica innata en células cancerosas HeLa y K562.

2.4.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de los ciclodipéptidos sobre la activación de la vía de los receptores tipo Toll (TLR) en las líneas celulares HeLa y K562.
- Determinar el efecto de los ciclodipéptidos en la producción de citocinas anti y proinflamatorias en las líneas celulares HeLa y K562.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Medios de cultivo

- ✓ DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

Medio completo. Composición: Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham con L-glutamina y 15 mM de HEPES 15.6 g/L, NaHCO₃ 1.5 g/L, Penicilina/Estreptomicina 10,000 U/mL de Penicilina y 10 mg/mL de estreptomicina (Sigma) 1%, suero fetal bovino (SFB, Sigma) 10%.

Medio incompleto. Composición: Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham con L-glutamina y 15 mM de HEPES 15.6 g/L, NaHCO₃ 1.5 g/L

- ✓ RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium)

Medio completo. Composición: Roswell Park Memorial Institute Medium con 2 mM L-glutamina y 10 mM de HEPES, 1 mM piruvato sódico, 4500 mg/L glucosa y 1500 mg/L, NaHCO₃ 1.5 g/L, Penicilina/Estreptomicina 10,000 U/mL de Penicilina, 10 mg/mL de estreptomicina (Sigma) 1%, suero fetal bovino (SFB, Sigma) 10%.

Medio incompleto. Composición: Roswell Park Memorial Institute Medium con 2 mM L-glutamina y 10 mM de HEPES, 1 mM piruvato sódico, 4500 mg/L glucosa y 1500 mg/L, NaHCO₃ 1.5 g/L.

Cabe destacar que los dos medios de cultivo se ajustan a un pH de 7.4

3.2 Líneas celulares

Línea celular HeLa (ATCC® CCL-2™): Células epiteliales humanas aisladas de un adenocarcinoma de cérvix, propagadas en medio DMEM suplementado con 5% de SFB.

Línea celular K562 (ATCC® CCL-243™): Células de leucemia mieloide crónica humanas propagadas en medio RPMI suplementado con 10% de SFB.

3.3 Crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1

Se cultivó *P. aeruginosa* cepa PAO1 en medio Luria-Bertani que contiene 10 g/L de peptona de caseína (Bi-oxón de México S.A) 5/L g de extracto de levadura (Merck-México S.A) y 5 g/L de NaCl (Sigma Chemical Corporation) a un pH de 7.0.

3.4 Extracción de ciclodipéptidos

Se prepararon 100 mL de medio líquido (LB) y se inocularon con *Pseudomonas aeruginosa* (preinóculo), se incubaron 12–18 horas con movimiento a 37 °C, posteriormente se tomaron del preinóculo 50 mL, se introdujeron en matraces con 960 mL de medio LB y se incubaron por 48 horas a 30 °C con movimiento a 125 rpm. Al finalizar el periodo de incubación las bacterias fueron removidas por centrifugación a 3500 rpm por 15 min a temperatura ambiente, los sobrenadantes fueron extraídos tres veces por 2 min cada una con un volumen igual de acetato de etilo (J.T. Baker) acidificado con ácido acético glacial (J.T. Baker) a una concentración de 0.01%. Se desechó la fase acuosa y las fases orgánicas se colectaron en un matraz balón para ser evaporadas a sequedad por evaporación rotativa (Rotavapor, Buchi R-215) a 60 °C. El residuo fue redisolto en 1 mL de metanol: acetonitrilo 1:1 grado HPLC (J.T. Baker), los extractos se concentraron hasta sequedad en vacío (Concentrador Labconco) y se almacenaron a 4 °C hasta

el momento de su análisis. Para verificar la presencia y pureza de los CDP se realizó un análisis mediante HPLC.

3.5 Cultivo celular

Para la línea celular HeLa se utilizó medio DMEM (Dulbecco modified Eagles minimal essential médium) y para células K562 medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute médium).

Las células HeLa tienen la característica de adherirse al fondo de la caja Petri, una vez que las células comienzan a crecer y alcanzan una monocapa confluyente, para evitar que mueran es necesario separarlas realizando “pases”. En la línea celular HeLa se agrega una solución de tripsina, para posteriormente bloquear la acción de esta solución con medio completo DMEM, una vez las células libres se pueden volver a resembrar con las concentraciones indicadas según el experimento.

En cambio, las células K562 son células en suspensión así que sus pases es tomar una pequeña cantidad de cultivo que contenga unas pocas células y se diluye en un volumen mayor de medio fresco.

3.6 Tratamiento con los ciclodipeptidos (CDP)

El tratamiento con los ciclodipeptidos se realizó a una concentración de 0.01 mg/mL, estos CDP se diluyeron en solución dimetilsulfóxido (DMSO). Para el caso de K562 se utilizaron tiempos de 0, 15 minutos y 2 horas, esto a que esta línea celular es más sensible a comparación de HeLa en la cual se usaron tiempos de 0, 30 minutos y 4 horas.

3.7 Lisis celular

Al finalizar el tiempo de tratamiento con, el medio de cultivo se separó de las células HeLa, en las células K562 se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min para

separar las células del medio y se guardó el medio en frascos de 50 mL y se almacenó hasta su uso a -80 °C.

En las cajas de las células HeLa se despegaron con 2 mL de tripsina dejándola actuar de 3 a 4 minutos, y se agregaron la misma cantidad de medio completo DMEM para bloquear la acción de la tripsina, se despegaron las células y se pasaron a tubo de 15 mL para centrifugarlas por 10 min a 10,000 rpm.

Para HeLa y K562 después de obtener la pastilla de células, se agregó PBS frío para hacer un lavado, posteriormente se agregó buffer S6K para sonicarlas a una amplitud de 30-40 por 10 segundos. De nuevo, se centrifugaron a 10000 rpm por 15 minutos y se guardaron las muestras de sobrenadantes a -80 °C. Todo este proceso se realizó a una temperatura de 4 °C.

3.8 Geles desnaturizantes SDS-PAGE

Las proteínas totales obtenidas de la lisis celular se cuantificaron mediante el método de Bradford. Se tomaron 30 µg de proteínas de cada muestra las cuales fueron suspendidas en buffer de carga, se calentaron a 100 °C por 10 min en el termoblock.

Las muestras fueron cargadas en un gel de acrilamida desnaturizante SDS-PAGE (gel separador: 12% de acrilamida. Gel concentrador: 5% de acrilamida). Se usó el sistema Bio-Rad Mini-PROTEAM Tetra System y la electroforesis se corrió a 120V durante 2 horas.

3.9 Western Blot

3.9.1 Transferencia de proteínas

Después de la electroforesis del gel SDS-PAGE se realizó la transferencia de proteínas, se cortó la membrana de PVDF del tamaño del gel de acrilamida, el sistema se colocó en el siguiente orden: 1. Base; 2. Papel filtro ultra grueso BioRad; 3. Membrana de PVDF; 4. Gel de acrilamida; 5. Papel filtro ultra grueso biorad; 6. Tapa del cátodo con seguros y 7. Tapa de seguridad. Antes de que fuera armado el

sistema los papeles filtros fueron humedecidos con buffer de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%), el gel se transfirió a 137 mA por 60 min. Se tiñó el gel con azul brillante de Coomassie para comprobar la transferencia.

3.9.2 Inmuno-detección

En un recipiente se colocó la membrana con 10 mL de TBS-T (Tris-HCL 10 mM; NaCl 0.9%; tween 0.1% pH 7.8) durante 15 minutos en agitación constante a temperatura ambiente, se desechó el TBS-T cada 5 minutos y se cambió por TBS-T con solución de bloqueo (leche 5%), se puso a bloquear durante una hora en agitación constante, después del bloqueo la membrana al ser lavada con agitación tres veces con 10 mL de TBS-T 5 minutos. Se diluyeron los anticuerpos primarios a utilizar (TLR2, TLR4, TLR10, MyD88, κ Ba, p- κ Ba y NF- κ B) por separado en TBS-T con leche al 5% y se agregó a la membrana incubándose toda la noche en agitación suave a 4 °C. Transcurrido este tiempo, la membrana se lavó tres veces con TBS-T durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después se diluyó el anticuerpo secundario en TBS-T y leche al 5% y se incubó con la membrana durante 3 a 4 horas en agitación suave a temperatura ambiente. La membrana fue lavada 3 veces con TBS-T a 0.15 M por periodos de 5 minutos y una vez con TBS durante 10 minutos. El revelado se realizó en un recipiente donde se añadió 1 mL de la solución de revelado agitando suavemente para cubrir toda la membrana, se colocó en el cassette del fotodocumentador para su posterior revelado con ayuda del software Image Lab.

3.10 Determinación de citocinas

Se realizó la determinación de las citocinas inflamatorias TNF- α e IL-6 a través de la prueba de ELISA. Se usó el kit de ELISA de la marca CAYMAN Chemicals®. Se siguieron los siguientes pasos los cuales ya están establecidos en el instructivo de este kit.

Primero se añadió 100 μ L de las muestras en cada pozo. Cada muestra se realizó por duplicado, se cubrió la caja y se incubó por 1 hora a temperatura

ambiente en agitación constante. Se vaciaron los pozos y se enjuagó 5 veces con buffer de lavado, se añadió 100 µL de anti IL-6 reconstituido para cada pozo de la caja, se cubrió e incubó por 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante.

Se vació la caja nuevamente y se enjuagó con buffer de lavado por 5 veces, se añadió 100 µL de Estraptavidina-HRP en cada pozo, se cubrió la caja y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente en agitación constante. Posterior a esa incubación, se enjuagó con buffer de lavado por 5 veces, se añadió 100 µL de solución TMB sustrato para cada pozo, se cubrió la caja y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, posterior a este tiempo se añadió 100 µL de solución de paro HRP para cada pozo y se leyó en un lector de placas a una longitud de onda de 450 nm.

4. RESULTADOS

4.1 Los CDP de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 estimulan la expresión de TLR2 y TLR10 en la línea celular K562.

Con el objetivo de analizar el efecto de los ciclodipéptidos en la vía de señalización de los TLR, se realizaron tratamientos de tiempo cero (control), 15 minutos y 2 horas en la línea celular K562. Los TLR que se analizaron fueron 3: TLR2, TLR4 y TLR10 ya que son los que se encuentran presentes en las dos líneas celulares a usar. La concentración de los CDP que se usó fue 0.01 mg/mL ya que

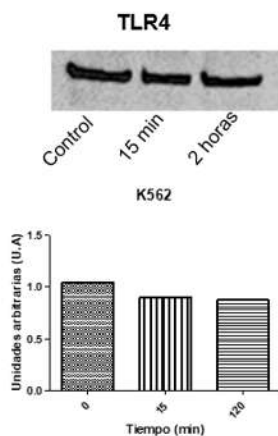


Figura 4. Expresión de TLR4 por CDP de *P. aeruginosa* PAO1 en la línea celular K562

en de nuestro grupo de trabajo se observó que es la concentración que mejores resultados genera.

En la figura 4, se observa que la expresión de TLR4 se mantiene en cantidades similares con los tratamientos con CDP respecto al control. Por otro lado, la expresión de TLR2 en la línea celular K562 aumenta a los 15 y 120 minutos el tratamiento con los CDP. (Figura 5). La expresión de TLR10 también se modificó en presencia de los CDP; el incremento en su expresión fue directamente proporcional al tiempo que duró el tratamiento (Figura 6).

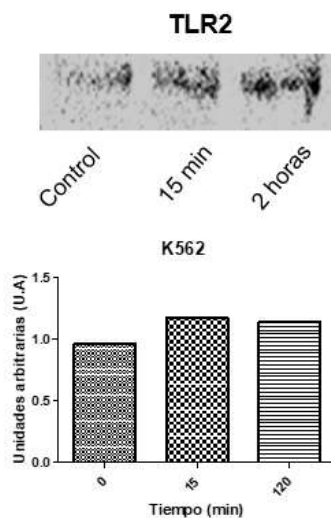


Figura 5. Expresión de TLR2 en la línea celular K562 con tratamientos de CDP de *P. aeruginosa* PAO1.

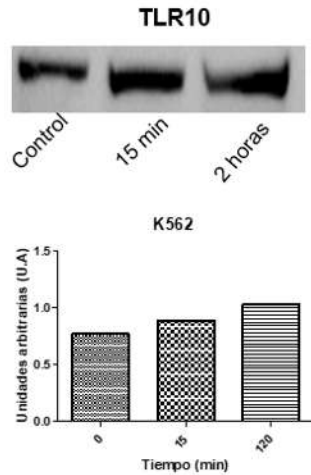


Figura 6. Expresión de TLR10 en la línea celular K562 con tratamientos de CDP de *P. aeruginosa* PAO1.

Los resultados demuestran que el tratamiento con los CDP a los dos tiempos evaluados (15 y 120 minutos) en la línea celular K562 estimulan la expresión de TLR2 y TLR10, mientras que la expresión de TLR4 no presento diferencias respecto al control.

La proteína adaptadora MyD88, es un nodo central en las vías inflamatorias ya que puede conducir a la producción de citocinas proinflamatorias o antiinflamatorias (Deguine & Barton, 2014) por lo que también se evaluó la expresión de esta proteína.

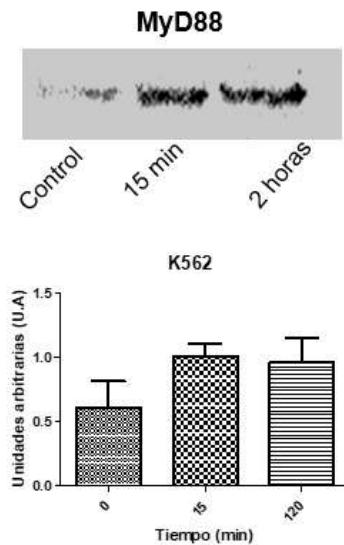


Figura 7. Expresión de la proteína MyD88 en la línea celular K562

Los resultados obtenidos muestran que la expresión de esta proteína se modificó a los 15 y 120 minutos de los tratamientos con los CDP (Figura 7). Desde los 15 minutos de tratamiento se aprecia un incremento en la expresión de estas proteínas el cual se mantuvo hasta los 120 minutos.

El factor nuclear $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ funciona para inhibir el factor de transcripción NF- κB , esto quiere decir que al estar activo este factor nuclear no se logra la activación de NF- κB . La inmunodetección realizada a esta proteína muestra que la expresión de esta proteína bajó conforme al tiempo de exposición de las células con los CDP (Figura 8)

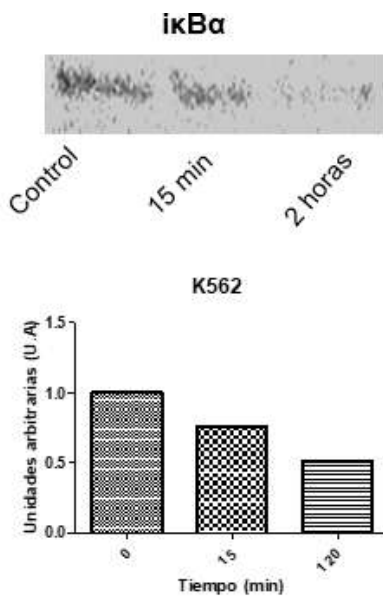


Figura 8. Expresión de la proteína $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ en la línea celular K562.

La activación de la proteína $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ fosforilada es necesaria para que el factor de transcripción NF- κB se trasloque al núcleo. El tratamiento con los CDP se evaluó inmunodetectando a la proteína fosforilada. La figura 9 muestra que el tratamiento con los CDP incrementó de forma gradual la expresión de p- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$.

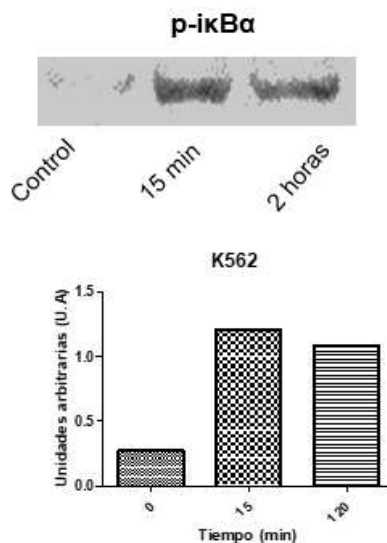


Figura 10. Expresión de la proteína $\kappa B\alpha$ fosforilada en la línea celular K562.

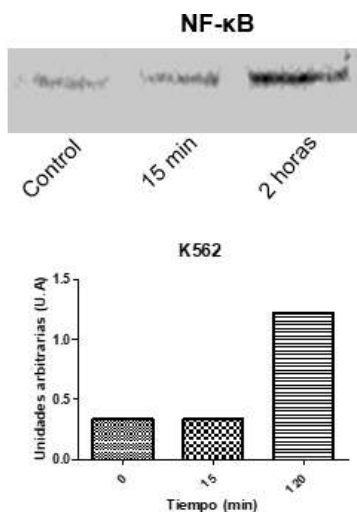


Figura 9. Expresión de NF- κB en la línea celular K562

También la expresión de NF- κB en la línea celular K562 se analizó para observar si este factor nuclear se activó en respuesta al tratamiento con CDP. El resultado obtenido (figura 10) muestra que a los 120 minutos de la exposición de las células K562 con los CDP incrementó considerablemente la expresión de este complejo proteico.

3.2 Los CDP de *P. aeruginosa* PAO1 no modifican la expresión de TLR4 en la línea celular HeLa

Como se mencionó anteriormente, con el objetivo de analizar la expresión de la vía de señalización de los receptores tipo Toll, se realizaron tratamientos con CDP de *P. aeruginosa* PAO1 a una concentración de 0.01 mg/mL en la línea celular HeLa. La duración de las incubaciones fueron a 0 min, 30 min y 240 min.

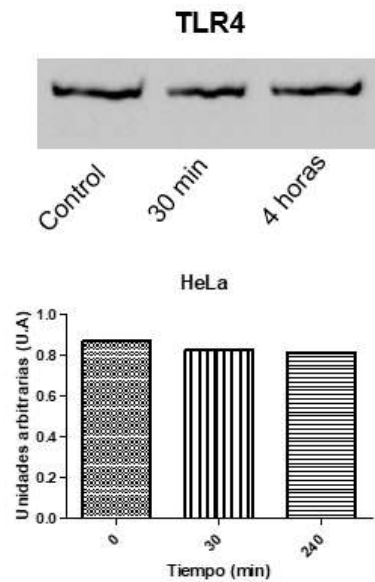


Figura 11. Expresión de TLR4 por CDPs de *P. aeruginosa* PAO1 en la línea celular HeLa.

En la figura 11, se observa que la expresión de TLR4 no se ve afectada en los tratamientos con los ciclodipéptidos. En cambio, en la figura 12 se demuestra que la expresión de TLR2 en el tratamiento de 2 horas, su expresión es nula. En el Western blot con el anticuerpo de TLR10, la expresión de 30 minutos en el tratamiento baja y sube en el tiempo 240 minutos (Figura 13).

Como antes ya se había mencionado, se midió la expresión de la proteína MyD88, la cual es una proteína crucial en la vía de señalización de TLR.

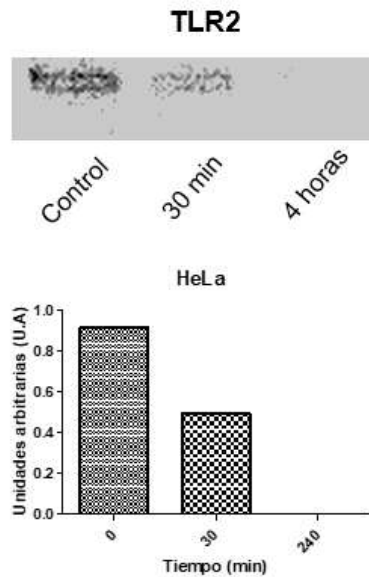


Figura 12. Expresión de TLR2 por CDP de *P. aeruginosa* PAO1 en la línea celular HeLa.

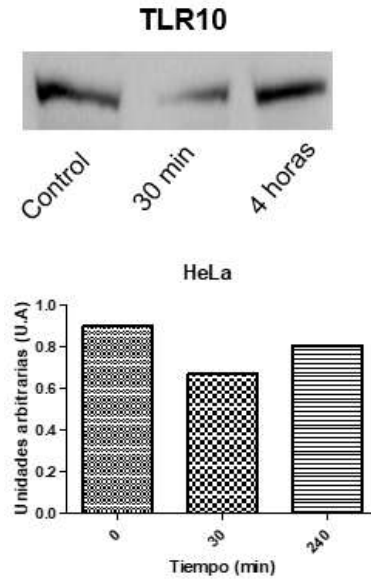


Figura 13. Expresión de TLR10 en la línea celular HeLa

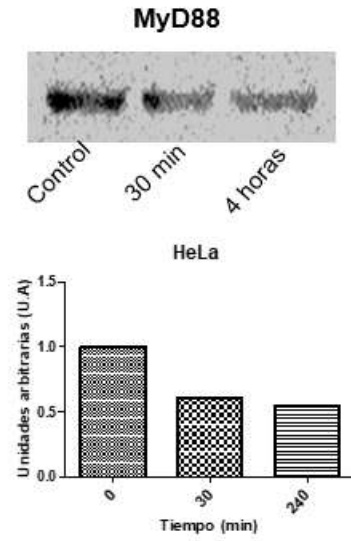


Figura 14. Expresión de la proteína adaptadora MyD88 en HeLa

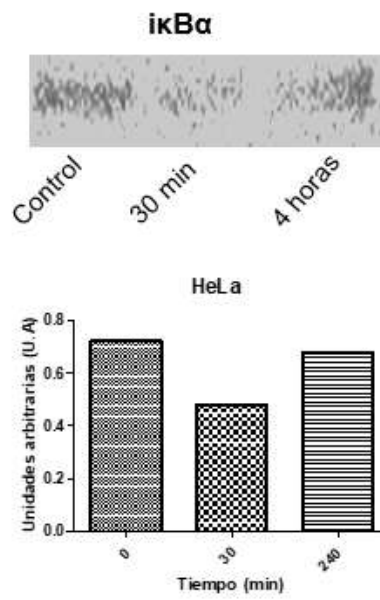


Figura 15. Expresión de la proteína ikB α en la línea celular HeLa.

De acuerdo a las figuras anteriores, se observa que la expresión de $\text{ikB}\alpha$ se mantiene con los tratamientos y el control, también en $\text{ikB}\alpha$ fosforilada, que es la que se ocupa que se active para que se active $\text{NF-}\kappa\text{B}$, se observa que va disminuyendo su expresión respecto al tiempo. En cambio $\text{NF-}\kappa\text{B}$, su expresión se ve que va aumentando conforme al tiempo en los tratamientos de los ciclodipéptidos, eso quiere decir que $\text{NF-}\kappa\text{B}$ se está activando por otra vía de señalización y no por la de los receptores tipo Toll.

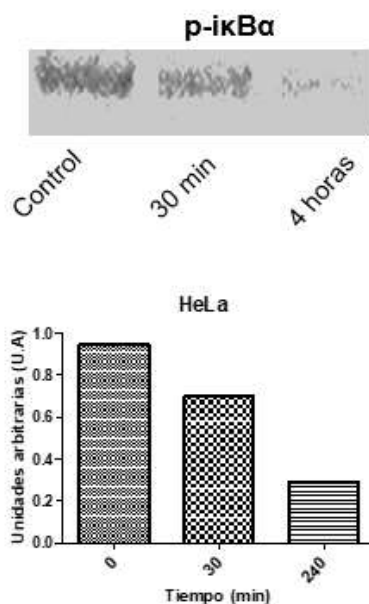


Figura 16. Expresión de la proteína $\text{p-ikB}\alpha$ en la línea celular HeLa

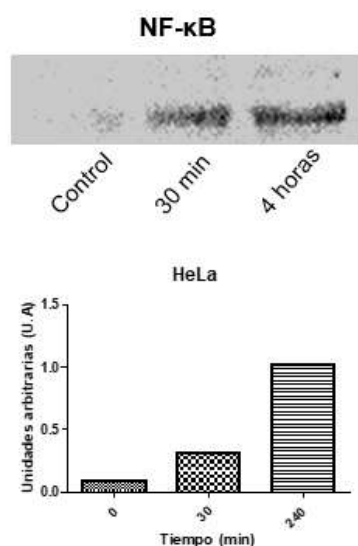


Figura 17. Expresión de la proteína $\text{NF-}\kappa\text{B}$ en la línea celular HeLa

3.3 El tratamiento con los CDP no modifico la producción de citocinas en las líneas celulares HeLa y K562.

Para determinar si el tratamiento con los CDP estimuló la producción de citocinas en las líneas celulares K562 y HeLa, se realizó la determinación mediante el kit de ELISA. En la línea celular HeLa también se usó lipopolisacáridos (LPS) ya que es un control positivo de la producción de citocinas, es decir, ellos siempre producen citocinas. En las células del sistema inmunológico, los lipopolisacáridos al unirse a su receptor específico, TLR4 activa una cascada de señalización en la cual está el factor nuclear kappa-B (NF- κ B), el cual se transloca al núcleo y se une a la región promotora del ADN de los genes que codifican para citocinas. Con el fin de poner a prueba la presencia de este mismo mecanismo en las células HeLa, mantuvimos las células en presencia de LPS.

Los niveles de producción de TNF- α se mantienen en las dos líneas celulares tanto en HeLa como en K562, lo que indica que el tratamiento con CDP no induce la secreción de esta citocina (Figura 18).

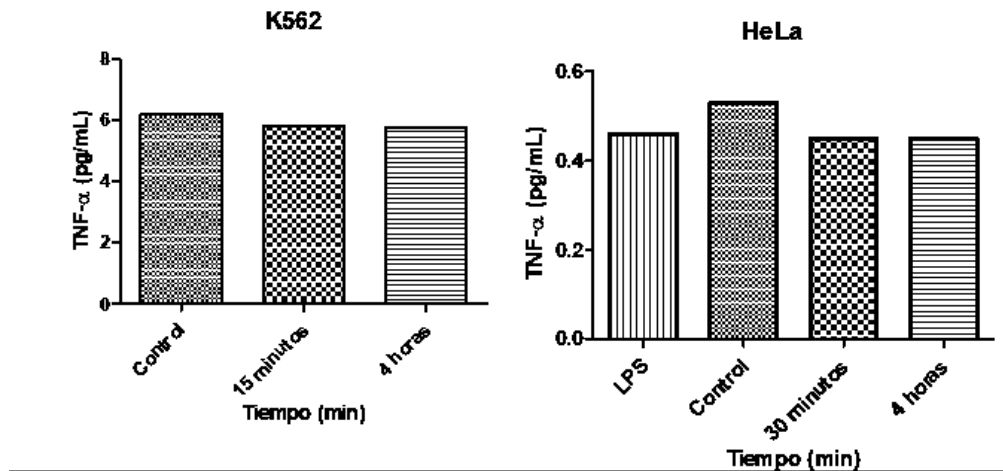


Figura 17. Expresión de TNF- α en las líneas celulares HeLa y K562

En la Figura 19, se observa que los niveles de producción de IL-6 se mantienen estables en la línea celular K562, mientras que en la línea celular HeLa se observó que incrementa la producción de IL-6 en los tratamientos con CDPs respecto al control.

Por otro lado, para la producción de IL-10 se analizó mediante Western Blot en las dos líneas celulares, pudiéndose observar que la expresión de esta citocina en K562 se mantuvo sin cambios en los tratamientos con los ciclodipeptidos respecto al control, en cambio en la línea celular HeLa la producción de esta citocina presentó una disminución en el tratamiento de 4 horas con los CDPs (Figura 20).

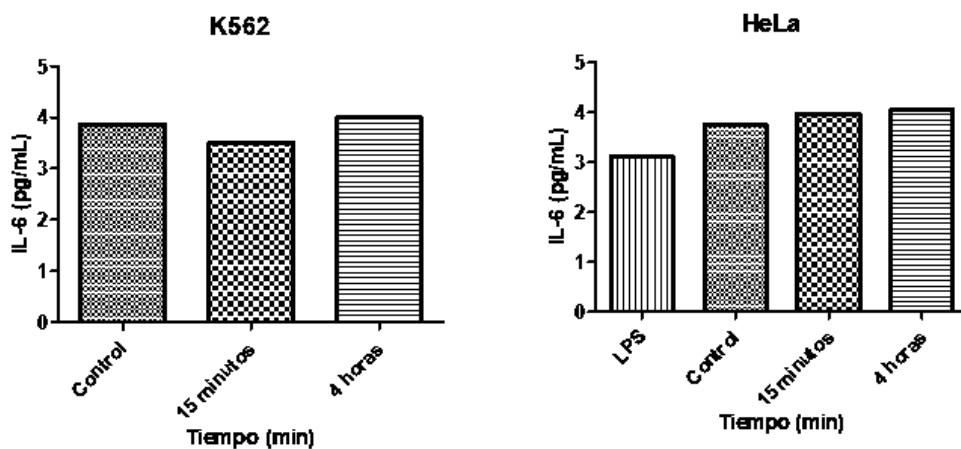


Figura 19. Expresión de IL-6 en las líneas celulares HeLa y K562.

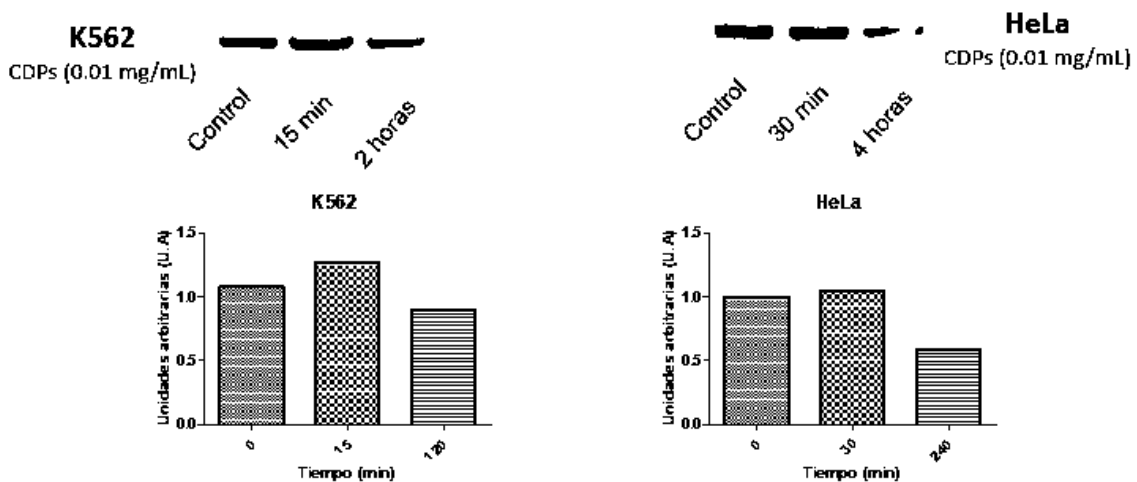


Figura 20. Expresión de IL-10 en las líneas celulares HeLa y K562.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los TLR se expresan en varias células cancerígenas humanas por ejemplo: el cáncer colorrectal, el cáncer gástrico, el cáncer de mama, el cáncer de páncreas, melanoma, entre otros (Chen *et al.*, 2022).

El tratamiento con CDP la línea celular K562, se observó que activó al receptor tipo toll 2. El TLR2 es capaz de activar la respuesta inmunológica innata y tiene un rol antitumoral en las células cancerígenas (Chen *et al.*, 2022). La activación del TLR2 en cáncer gástrico estimula la proliferación y también inhibió los factores de apoptosis por medio de la vía de señalización de MAPK (Meng *et al.*, 2020). También se ha demostrado que la activación de TLR2 mejora la producción de especies reactivas de oxígenos en células de cáncer de colón (NCM460, HT29 y CaCo-2), y en la proliferación de células tumorales (Tsoi *et al.*, 2017). Por otra parte, la expresión del TLR10 en la línea celular K562 incrementó en relación al tiempo con los tratamientos de los CDP, actualmente hay pocos estudios de este TLR pero se ha descubierto que el heterodímero TLR2/TLR10 es el responsable de la activación de NF-kB (Fore *et al.*, 2020). En otro estudio se observó que al activarse este receptor, la producción de citocinas proinflamatorias (IL-6 y TNF α) se reduce (Hess *et al.*, 2017) sin embargo, el tratamiento con los CDP en estas células no mostró cambios en la producción de citocinas. También en otro estudio se observó que al activarse este receptor, la producción de citocinas proinflamatorias (IL-6 y TNF α) se reduce (Hess *et al.*, 2017).

En la línea celular HeLa, solo TLR2 bajó su producción respecto al tiempo de tratamiento con los CDP. En un reciente trabajo de cáncer colorrectal en ratones, se mostró que la eliminación de TLR2 da como resultado la inhibe del crecimiento de este cáncer (Meng *et al.*, 2020).

MyD88 es una proteína adaptadora indispensable para la vía de señalización de TLR. En la línea celular K562 se observó que se activa esta proteína adaptadora. Se sabe que en el cáncer de vejiga un aumento de los niveles de expresión de TLR2

y TLR4 induciendo así la activación de MyD88 y NF- κ B para aumentar la secreción de citocinas inflamatorias, en este caso TNF- α (O'Neill *et al.*, 2013).

En la vía de señalización de TLR, río abajo está la proteína I κ B α en su estado fosforilado, la cual en la línea celular K562 se observa que se está activando y que debido a esto se active NF- κ B y se trasloque al núcleo. La activación de NF- κ B en células mieloides aumentan la inflamación del microambiente tumoral y esto por consecuencia aumenta la secreción de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6, y esto conduce una rápida proliferación de células tumorales (Terzić *et al.*, 2010); también la activación de este marcador protege a las células cancerosas de la apoptosis y podría participar para las terapias de quimiorradiación (Xia *et al.*, 2014).

Por otro lado, la interleucina 10 es una citocina antiinflamatoria que promueve la proliferación de células tumorales y metástasis a través de la inmunosupresión. En nuestros resultados se observó una baja secreción pero se necesitaría hacer otros experimentos para ver si los tratamientos con los CDP secretan citocinas anti o proinflamatorias y así se observe el ambiente tumoral de estos tratamientos.

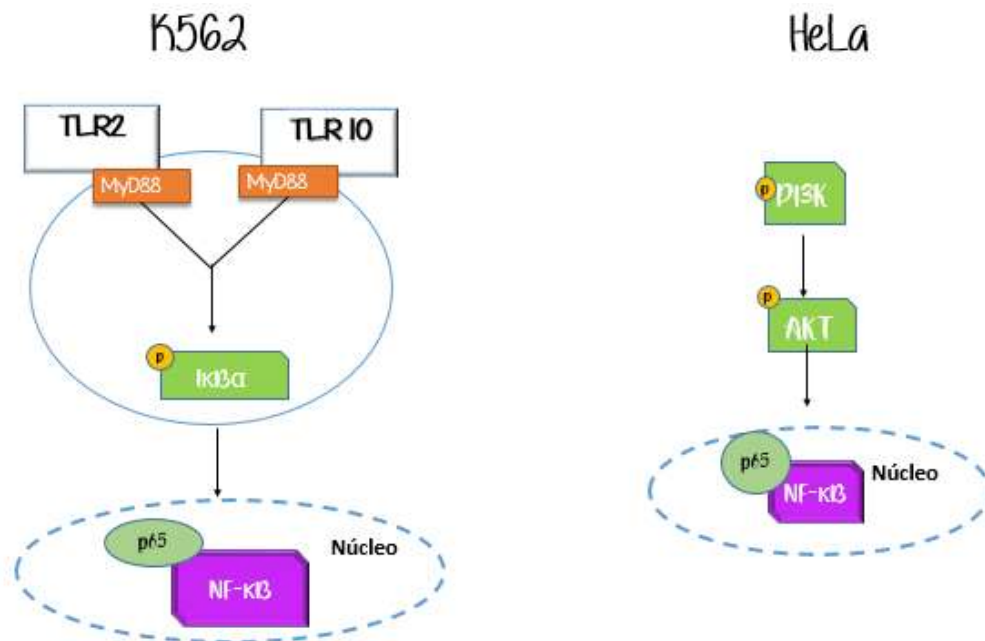


Figura 21. Vías de señalización con tratamientos de CDP en línea celular K562 y HeLa

En la Figura 21, se puede observar las vías de señalización de cada línea celular conforme a nuestros resultados. En K562, se activa TLR2 y TLR10 junto a su proteína adaptadora MyD88, a su vez la activación de la proteína $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ fosforilada y NF- κB para la secreción de citocinas. Se debería de evaluar en próximos trabajos si otros tipos de TLR se activan en estas dos líneas celulares, además de evaluar la secreción de más citocinas para así determinar el ambiente tumoral en el que estarán.

En HeLa, se puede apreciar que NF- κB se está activando por otra vía diferente a TLR, esto por los antecedentes que hay en el equipo de trabajo. Hernández-Padilla en 2020, observó que las células HeLa con los tratamientos de CDPs activaron PI3K fosforilada y a su vez esta activó a AKT fosforilada y se conoce que estas dos proteínas fosforiladas están implicadas también en la activación de NF- κB .

5. CONCLUSIONES

- En la línea celular K562, se activaron los TLR 2 y TLR10 que actúa como heterodímeros en la vía de señalización.
- Los CDP estimulan la activación de NF- κB en las células K562 y HeLa.
- El tratamiento de células HeLa con CDP a una concentración de 0.01 mg/mL regula a la baja la expresión que codifica a la citocina anti-inflamatoria IL-10.
- Se necesitan más estudios para determinar la codificación de citocinas pro y anti inflamatorias para así determinar el microambiente tumoral de estos tratamientos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggarwal, B. B. (2004). Nuclear factor-kappaB: The enemy within. *Cancer Cell*, 6(3), 203-208. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.09.003>
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., & Johnson, A. (2006). *Introducción a la biología celular* (2a ed.). Medica Panamericana.
- Awasthi, S. (2014). Toll-like receptor-4 modulation for cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 5, 328. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00328>
- Baccarani M, Pileri S, Steegmann JI, Muller M, Soverini S, Dreyling M, & undefined. (2012). Chronic myeloid leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 23 Suppl 7, vii72-7. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds228>
- Barrera-Rodríguez, R., Peralta-Zaragoza, O., & Madrid-Marina, V. (1995). Bases moleculares de la inmunología del cáncer. *Salud Pública de México*, 37(4), 344-353.
- Barton, G. M. (2008). A calculated response: Control of inflammation by the innate immune system. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(2), 413-420. <https://doi.org/10.1172/JCI34431>
- Begum Ahil, S., Hira, K., Shaik, A. B., Pal, P. P., Kulkarni, O. P., Araya, H., & Fujimoto, Y. (2019). l-Proline-based-cyclic dipeptides from *Pseudomonas* sp. (ABS-36) inhibit pro-inflammatory cytokines and alleviate crystal-induced renal injury in mice. *International Immunopharmacology*, 73, 395-404. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.05.044>
- Belmont, L., Rabbe, N., Antoine, M., Cathelin, D., Guignabert, C., Kurie, J., Cadranet, J., & Wislez, M. (2014). Expression of TLR9 in tumor-infiltrating mononuclear cells enhances angiogenesis and is associated with a worse survival in lung cancer. *International Journal of Cancer*, 134(4), 765-777. <https://doi.org/10.1002/ijc.28413>
- Berraondo, P., Minute, L., Ajona, D., Corrales, L., Melero, I., & Pio, R. (2016). Innate immune mediators in cancer: Between defense and resistance. *Immunological Reviews*, 274(1), 290-306. <https://doi.org/10.1111/imr.12464>
- Budesinsky, M., Cisarova, I., Podlaha, J., Borremans, F., Martins, J., Waroquier, M., & Pauwels, E. (2010). Structures of cyclic dipeptides: An X-ray and computational study of cis- and trans-cyclo (Pip-Phe), cyclo (Pro-Phe) and their N-methyl

- derivatives. *ACTA CRYSTALLOGRAPHICA SECTION B-STRUCTURAL SCIENCE*, 66(6), Article 6. <https://doi.org/10.1107/S0108768110040243>
- Chen, X., Zhang, Y., & Fu, Y. (2022). The critical role of Toll-like receptor-mediated signaling in cancer immunotherapy. *Medicine in Drug Discovery*, 14, 100122. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2022.100122>
- Chow, M. T., Möller, A., & Smyth, M. J. (2012). Inflammation and immune surveillance in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 22(1), 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2011.12.004>
- D'Agostini, C., Pica, F., Febbraro, G., Grelli, S., Chiavaroli, C., & Garaci, E. (2005). Antitumour effect of OM-174 and cyclophosphamide on murine B16 melanoma in different experimental conditions. *International Immunopharmacology*, 5(7-8), 1205-1212. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2005.02.013>
- Datta, N. R., Ordóñez, S. G., Gaipl, U. S., Paulides, M. M., Crezee, H., Gellermann, J., Marder, D., Puric, E., & Bodis, S. (2015). Local hyperthermia combined with radiotherapy and/or chemotherapy: Recent advances and promises for the future. *Cancer Treatment Reviews*, 41(9), 742-753. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.05.009>
- Deguine, J., & Barton, G. M. (2014). MyD88: A central player in innate immune signaling. *F1000Prime Reports*, 6, 97. <https://doi.org/10.12703/P6-97>
- De-hai, L., Qian-qun, G., & Wei-ming, Z. (2005). *Antitumor components from marine actinomycete 11014. Cyclic dipeptides, Chin, J. Antibiot.*
- Deininger, M. W. N., Goldman, J. M., & Melo, J. V. (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 96(10), 3343-3356. <https://doi.org/10.1182/blood.V96.10.3343>
- Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 4(1), 11-22. <https://doi.org/10.1038/nrc1252>
- Durán-Maldonado, M. X., Hernández-Padilla, L., Gallardo-Pérez, J. C., Díaz-Pérez, A. L., Martínez-Alcantar, L., Reyes De la Cruz, H., Rodríguez-Zavala, J. S., Pacheco-Rodríguez, G., Moss, J., & Campos-García, J. (2020). Bacterial Cyclodipeptides Target Signal Pathways Involved in Malignant Melanoma. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01111>
- Fabbro, D. (2012). A new STATus in CML. *Nature Chemical Biology*, 8(3), 228-229. <https://doi.org/10.1038/nchembio.900>

- Finking, R., & Marahiel, M. (2004). Biosynthesis of Nonribosomal Peptides 1. *Annual review of microbiology*, 58, 453-488. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123615>
- Finn, O. J. (2012). Immuno-oncology: Understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 23 Suppl 8, viii6-9. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds256>
- Fore, F., Indriputri, C., Mamutse, J., & Nugraha, J. (2020). TLR10 and Its Unique Anti-Inflammatory Properties and Potential Use as a Target in Therapeutics. *Immune Network*, 20(3), e21. <https://doi.org/10.4110/in.2020.20.e21>
- Furumoto, K., Soares, L., Engleman, E. G., & Merad, M. (2004). Induction of potent antitumor immunity by in situ targeting of intratumoral DCs. *The Journal of Clinical Investigation*, 113(5), 774-783. <https://doi.org/10.1172/JCI19762>
- Gao, W., Xiong, Y., Li, Q., & Yang, H. (2017). Inhibition of Toll-Like Receptor Signaling as a Promising Therapy for Inflammatory Diseases: A Journey from Molecular to Nano Therapeutics. *Frontiers in Physiology*, 8, 508. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00508>
- Gondry, M., Sauguet, L., Belin, P., Thai, R., Amouroux, R., Tellier, C., Tophile, K., Jacquet, M., Braud, S., Courçon, M., Masson, C., Dubois, S., Lautru, S., Lecoq, A., Hashimoto, S., Genet, R., & Pernodet, J.-L. (2009). Cyclodipeptide synthases are a family of tRNA-dependent peptide bond-forming enzymes. *Nature Chemical Biology*, 5(6), 414-420. <https://doi.org/10.1038/nchembio.175>
- Greten, F. R., & Grivnickov, S. I. (2019). Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity*, 51(1), 27-41. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.06.025>
- Grossman, Z., & Herberman, R. B. (1986). 'Immune surveillance' without immunogenicity. *Immunology Today*, 7(5), 128-131. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(86\)90075-7](https://doi.org/10.1016/0167-5699(86)90075-7)
- Gu, J., Liu, Y., Xie, B., Ye, P., Huang, J., & Lu, Z. (2018). Roles of toll-like receptors: From inflammation to lung cancer progression. *Biomedical Reports*, 8(2), 126-132. <https://doi.org/10.3892/br.2017.1034>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

- Harashima, N., Inao, T., Imamura, R., Okano, S., Suda, T., & Harada, M. (2012). Roles of the PI3K/Akt pathway and autophagy in TLR3 signaling-induced apoptosis and growth arrest of human prostate cancer cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 61(5), 667-676. <https://doi.org/10.1007/s00262-011-1132-1>
- He, W., Liu, Q., Wang, L., Chen, W., Li, N., & Cao, X. (2007). TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. *Molecular Immunology*, 44(11), 2850-2859. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.01.022>
- Hernández-Padilla, L., Reyes, H., & Jesús, C.-G. (2020). Antiproliferative effect of bacterial cyclodipeptides in the HeLa line of human cervical cancer reveals multiple protein kinase targeting, including mTORC1/C2 complex inhibition in a TSC1/2-dependent manner. *Apoptosis*, 25. <https://doi.org/10.1007/s10495-020-01619-z>
- Hernández-Padilla, L., Vázquez-Rivera, D., Sánchez-Briones, L. A., Díaz-Pérez, A. L., Moreno-Rodríguez, J., Moreno-Eutimio, M. A., Meza-Carmen, V., Cruz, H. R.-D. la, & Campos-García, J. (2017). The Antiproliferative Effect of Cyclodipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 on HeLa Cells Involves Inhibition of Phosphorylation of Akt and S6k Kinases. *Molecules*, 22(6), 1024. <https://doi.org/10.3390/molecules22061024>
- Herrero, C., & Pérez-Simón, J. A. (2010). Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas*, 43(5), 425-430. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2010007500033>
- Hess, N. J., Felicelli, C., Grage, J., & Tapping, R. I. (2017). TLR10 suppresses the activation and differentiation of monocytes with effects on DC-mediated adaptive immune responses. *Journal of Leukocyte Biology*, 101(5), 1245-1252. <https://doi.org/10.1189/jlb.3A1116-492R>
- Jain, A., Jain, A., Gulbake, A., Hurkat, Dr. P., & Jain, S. (2011). Solid tumors: A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3.
- Javid, N., & Choi, S. (2020). Toll-like Receptors from the Perspective of Cancer Treatment. *Cancers*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/cancers12020297>
- Kawai, T., & Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death and Differentiation*, 13(5), 816-825. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401850>

- Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11(5), 373-384. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>
- Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in Immunology*, 5, 461. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>
- Lee, H. (2013). Lee, H., & Park, H.J. (2013). Testing the impact of message interactivity on relationship management and organizational reputation. *Journal of Public Relations Research*, 25(2), 188-206. *Journal of Public Relations Research*, 25, 188-206.
- Li, X., Commane, M., Jiang, Z., & Stark, G. R. (2001). IL-1-induced NFκB and c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation diverge at IL-1 receptor-associated kinase (IRAK). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(8), 4461. <https://doi.org/10.1073/pnas.071054198>
- Li, X., & Qin, L. (2005). Li, X. & Qin, L. Metagenomics-based drug discovery and marine microbial diversity. *Trends Biotechnol.* 23, 539-543. *Trends in biotechnology*, 23, 539-543. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.08.006>
- López, A., & Lizano, M. (2006). Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano. La historia que no termina. *Cancerología*, 1(Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer. UNAM), 31-55.
- Manicassamy, S., & Pulendran, B. (2009). Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors. *Seminars in Immunology*, 21(4), 185-193. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2009.05.005>
- Mariathasan, S., & Monack, D. M. (2007). Inflammasome adaptors and sensors: Intracellular regulators of infection and inflammation. *Nature Reviews. Immunology*, 7(1), 31-40. <https://doi.org/10.1038/nri1997>
- Maru, Y. (2012). Molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Cancer Science*, 103(9), 1601-1610. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2012.02346.x>
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428-435. <https://doi.org/10.1038/nature07201>
- Mehnaz, S., Saleem, R. S. Z., Yameen, B., Pianet, I., Schnakenburg, G., Pietraszkiewicz, H., Valeriote, F., Josten, M., Sahl, H.-G., Franzblau, S. G., & Gross, H. (2013). Lahorenic Acids A–C, ortho-Dialkyl-Substituted Aromatic Acids from the Biocontrol Strain *Pseudomonas aurantiaca* PB-St2. *Journal of Natural Products*, 76(2), 135-141. <https://doi.org/10.1021/np3005166>

- Meng, S., Li, Y., Zang, X., Jiang, Z., Ning, H., & Li, J. (2020). Effect of TLR2 on the proliferation of inflammation-related colorectal cancer and sporadic colorectal cancer. *Cancer Cell International*, 20(1), 95. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01184-0>
- Mitrus, I., Bryndza, E., Sochanik, A., & Szala, S. (2012). Evolving models of tumor origin and progression. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 33(4), 911-917. <https://doi.org/10.1007/s13277-012-0389-0>
- Nishimoto, N., Sasai, M., Shima, Y., Nakagawa, M., Matsumoto, T., Shirai, T., Kishimoto, T., & Yoshizaki, K. (2000). Improvement in Castleman's disease by humanized anti-interleukin-6 receptor antibody therapy. *Blood*, 95(1), 56-61. <https://doi.org/10.1182/blood.V95.1.56>
- Noh, J.-Y., Yoon, S. R., Kim, T.-D., Choi, I., & Jung, H. (2020). Toll-Like Receptors in Natural Killer Cells and Their Application for Immunotherapy. *Journal of Immunology Research*, 2020, 2045860. <https://doi.org/10.1155/2020/2045860>
- Nuyts, S., Van Mellaert, L., Theys, J., Landuyt, W., Lambin, P., & Anné, J. (2001). The use of radiation-induced bacterial promoters in anaerobic conditions: A means to control gene expression in clostridium-mediated therapy for cancer. *Radiation Research*, 155(5), 716-723. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2001\)155\[0716:tuorib\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2001)155[0716:tuorib]2.0.co;2)
- O'Neill, L. A. J. (2008). When signaling pathways collide: Positive and negative regulation of toll-like receptor signal transduction. *Immunity*, 29(1), 12-20. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.06.004>
- O'Neill, L. A. J., Golenbock, D., & Bowie, A. G. (2013). The history of Toll-like receptors—Redefining innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/nri3446>
- Patyar, S., Joshi, R., Byrav, D. S. P., Prakash, A., Medhi, B., & Das, B. K. (2010). Bacteria in cancer therapy: A novel experimental strategy. *Journal of Biomedical Science*, 17(1), 21. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-17-21>
- Piras, V., & Selvarajoo, K. (2014). Beyond MyD88 and TRIF Pathways in Toll-Like Receptor Signaling. *Frontiers in Immunology*, 5, 70. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00070>
- Qin, Z., Noffz, G., Mohaupt, M., & Blankenstein, T. (1997). Interleukin-10 prevents dendritic cell accumulation and vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-modified tumor cells. *The Journal of Immunology*, 159(2), 770-776.

- Ressurreição, A. S. M., Delatouche, R., Gennari, C., & Piarulli, U. (2011). Bifunctional 2,5-Diketopiperazines as Rigid Three-Dimensional Scaffolds in Receptors and Peptidomimetics. *European Journal of Organic Chemistry*, 2011(2), 217-228. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201001330>
- Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Yang, J. C., Topalian, S. L., Chang, A. E., Schwartzentruber, D. J., Aebbersold, P., Leitman, S., Linehan, W. M., Seipp, C. A., White, D. E., & Steinberg, S. M. (1993). Prospective Randomized Trial of High-Dose Interleukin-2 Alone or in Conjunction With Lymphokine-Activated Killer Cells for the Treatment of Patients With Advanced Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 85(8), 622-632. <https://doi.org/10.1093/jnci/85.8.622>
- Ruysschaert, J.-M., & Loney, C. (2015). Role of lipid microdomains in TLR-mediated signalling. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1848(9), 1860-1867. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.03.014>
- Salaun, B., Coste, I., Rissoan, M.-C., Lebecque, S. J., & Renno, T. (2006). TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 176(8), 4894-4901. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.8.4894>
- Shanafelt, T. (2013). Treatment of older patients with chronic lymphocytic leukemia: Key questions and current answers. *Hematology*, 2013(1), 158-167. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2013.1.158>
- So, E. Y., & Ouchi, T. (2010). The application of Toll like receptors for cancer therapy. *International Journal of Biological Sciences*, 6(7), 675-681. <https://doi.org/10.7150/ijbs.6.675>
- Tefferi, A., & Vardiman, J. W. (2008). Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*, 22(1), 14-22. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404955>
- Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., & Karin, M. (2010). Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2101-2114.e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.058>
- Tirado-Gómez, L. L., Mohar-Betancourt, A., López-Cervantes, M., García-Carrancá, A., Franco-Marina, F., & Borges, G. (2005). Factores de riesgo de cáncer cervicouterino invasor en mujeres mexicanas. *Salud Pública de México*, 47(5), 342-350.
- Tracey, K. J., M. D., & Cerami, A., Ph. D. (1994). TUMOR NECROSIS FACTOR: A Pleiotropic Cytokine and Therapeutic Target. *Annual Review of Medicine*, 45(1), 491-503. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.45.1.491>

- Tsoi, H., Chu, E. S. H., Zhang, X., Sheng, J., Nakatsu, G., Ng, S. C., Chan, A. W. H., Chan, F. K. L., Sung, J. J. Y., & Yu, J. (2017). Peptostreptococcus anaerobius Induces Intracellular Cholesterol Biosynthesis in Colon Cells to Induce Proliferation and Causes Dysplasia in Mice. *Gastroenterology*, 152(6), 1419-1433.e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.01.009>
- Urban-Wojciuk, Z., Khan, M. M., Oyler, B. L., Fåhraeus, R., Marek-Trzonkowska, N., Nita-Lazar, A., Hupp, T. R., & Goodlett, D. R. (2019). The Role of TLRs in Anti-cancer Immunity and Tumor Rejection. *Frontiers in Immunology*, 10, 2388. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02388>
- Vadillo, E., & Pelayo, R. (2012). *Los receptores tipo Toll en el desarrollo y función del sistema hematopoyético*. 64(5), 461-476.
- Vázquez-Rivera, D., González, O., Guzmán-Rodríguez, J., Díaz-Pérez, A. L., Ochoa-Zarzosa, A., López-Bucio, J., Meza-Carmen, V., & Campos-García, J. (2015). *Cytotoxicity of Cyclodipeptides from Pseudomonas aeruginosa PAO1 Leads to Apoptosis in Human Cancer Cell Lines* [Research article]. BioMed Research International. <https://doi.org/10.1155/2015/197608>
- Ve, T., Williams, S. J., & Kobe, B. (2015). Structure and function of Toll/interleukin-1 receptor/resistance protein (TIR) domains. *Apoptosis*, 20(2), 250-261. <https://doi.org/10.1007/s10495-014-1064-2>
- Wei, H.-X., Fang, X.-W., Xie, X.-S., Zhang, S.-P., Jiang, Y., & Wu, S.-H. (2017). Secondary Metabolites of a Soil-Derived Streptomyces kunmingensis. *Chemistry of Natural Compounds*, 53(4), 794-796. <https://doi.org/10.1007/s10600-017-2125-x>
- Wicht, F., & Preisig, R. (1990). [Ambulatory, disulfiram-(Antabuse)-assisted management of the alcoholic patient]. *Therapeutische Umschau. Revue Therapeutique*, 47(5), 364-369.
- Wolska, A., Lech-Marañda, E., & Robak, T. (2009). Toll-like receptors and their role in carcinogenesis and anti-tumor treatment. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 14(2), 248-272. <https://doi.org/10.2478/s11658-008-0048-z>
- World Health Organization, (WHO). (2013). *World health statistics 2013*.
- Wu, Y., He, S., Bai, B., Zhang, L., Xue, L., Lin, Z., Yang, X., Zhu, F., He, P., Tang, W., & Zuo, J. (2016). Therapeutic effects of the artemisinin analog SM934 on lupus-prone MRL/lpr mice via inhibition of TLR-triggered B-cell activation and plasma cell formation. *Cellular & Molecular Immunology*, 13(3), 379-390. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.13>

- Xia, Y., Shen, S., & Verma, I. M. (2014). NF- κ B, an active player in human cancers. *Cancer immunology research*, 2(9), 823-830. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0112>
- Zhang, J.-M., & An, J. (2007). Cytokines, Inflammation and Pain. *International anesthesiology clinics*, 45(2), 27-37. <https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e>
- Zhang, M., Yan, Z., Wang, J., & Yao, X. (2017). Toll-like receptors 7 and 8 expression correlates with the expression of immune biomarkers and positively predicts the clinical outcome of patients with melanoma. *OncoTargets and Therapy*, 10, 4339-4346. <https://doi.org/10.2147/OTT.S136194>
- Zhang, Y., & Liang, C. (2016). Innate recognition of microbial-derived signals in immunity and inflammation. *Science China. Life Sciences*, 59(12), 1210-1217. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-0325-6>
- Zilionis, R., Engblom, C., Pfirschke, C., Savova, V., Zemmour, D., Saatioglu, H. D., Krishnan, I., Maroni, G., Meyerovitz, C. V., Kerwin, C. M., Choi, S., Richards, W. G., De Rienzo, A., Tenen, D. G., Bueno, R., Levantini, E., Pittet, M. J., & Klein, A. M. (2019). Single-Cell Transcriptomics of Human and Mouse Lung Cancers Reveals Conserved Myeloid Populations across Individuals and Species. *Immunity*, 50(5), 1317-1334.e10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.009>