

# Expresión del receptor tipo toll 7 en muestras de tejido con diagnóstico histopatológico de carcinoma escamoso de laringe

Cap. 1/o. Pas. Méd. Arturo Iván **Hernández-Bueno**,\* Cap. 1/o. Pas. Méd. Tania Lizbeth **Martínez-Cornejo**,\* Mayor M.C. Ricardo **Sánchez-Santana**,\* Mayor M.C. Isabel **Mora-Mendoza**,\* Dra. Ivonne Guadalupe **Fernández-Carrasco**,\* Mayor M.C. Raúl **Aragón-Franco**\*

Escuela Médico Militar-Hospital Central Militar. Ciudad de México.

## RESUMEN

**Introducción:** El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por alteraciones en las células, que tiene como resultado modificación en los oncogenes, en los genes supresores tumorales y en la estabilidad genética. El cáncer localizado en laringe representa uno de los padecimientos más frecuentes en la patología otorrinolaringológica. Las neoplasias en cabeza y cuello representan 17.6% (108,064) de la totalidad de las neoplasias malignas reportadas al Registro Histopatológico de Neoplasias en México (RHNM) en el año 2007. El 62% son carcinomas cutáneos.

**Material y métodos:** Se llevó a cabo un estudio retrospectivo, longitudinal de tipo descriptivo en 25 pacientes del Hospital Central Militar del Archivo de Patología de muestras patológicas, diagnosticadas como cáncer escamoso de laringe para el estudio del mismo. Criterios de inclusión: Muestras de tejidos con el diagnóstico histopatológico de cáncer escamoso de laringe. Criterios de exclusión: Muestras de tejido que no tengan el diagnóstico histopatológico de cáncer escamoso de laringe. Cantidad de muestra insuficiente para la realización de la inmunohistoquímica.

**Resultados:** En las 25 muestras de tejido pacientes el diagnóstico histopatológico de carcinoma escamoso de laringe fue: dos muestras de tejido laríngeo sano como control, 13 con el diagnóstico de cáncer laríngeo, cinco con el diagnóstico de cáncer de cuerdas vocales, dos con el diagnóstico de cáncer en glotis, uno con el diagnóstico de cáncer supraglótico, uno con el diagnóstico de cáncer en cartilago aritenoides y uno con el diagnóstico de cáncer en el seno piriforme. Se utilizó la técnica de inmunohistoquímica el laboratorio de Biología Celular y Tisular de la Torre de Laboratorios de la Escuela Médico Militar y en el área de inmunohistoquímica del Servicio de Patología del Hospital Central Militar, encontrando que la concentración adecuada del anticuerpo primario anti-TLR7 humano fue de 1:100. En las muestras de tejido laríngeo sano se observó que la expresión de TLR7 se encuentra exclu-

*Expression of toll-like receptor 7 in tissue samples with histopathological diagnosis of laryngeal squamous cell carcinoma of the Hospital Central Militar*

## SUMMARY

**Introduction:** Cancer is a disease characterized by alterations in the cells, which results in change in the oncogenes in the tumor suppressor genes and genetic stability. Located in larynx cancer is one of the most common diseases in the otorhinolaryngologic pathology. The head and neck cancers account for 17.6% (108,064) of all malignancies reported to the registry Histopathological Neoplasms in Mexico (RHNM) in 2007. 62% are skin cancer.

**Material and methods:** We conducted a retrospective, longitudinal descriptive in 25 patients of the Central Military Hospital of the Archives of Pathology, pathological specimens, diagnosed as squamous cell cancer of the larynx for the study of it. Inclusion criteria: Samples of tissue with the histopathologic diagnosis of squamous cancer of the larynx. Exclusion criteria: tissue samples with no histological diagnosis of squamous cancer of the larynx. Insufficient sample quantity to perform immunohistochemistry.

**Results:** In tissue samples from 25 patients the histological diagnosis of carcinoma of larynx: two healthy laryngeal tissue samples as controls, 13 with the diagnosis of laryngeal cancer, five with a diagnosis of vocal cord cancer, two with the diagnosis of glottis cancer, one with the diagnosis of supraglottic cancer, one diagnosed with cancer and one arytenoid cartilage with the diagnosis of cancer in the pyriform sinus. We used the technique of immunohistochemistry lab Cell and Tissue Biology Tower Laboratory and the Military Medical School in the area of immunohistochemical Pathology Department of the Central Military Hospital, finding that the appropriate concentration of primary antibody anti-human TLR7 was 1:100. In the healthy laryngeal tissue samples showed that the expression of TLR7 is found exclusively in

\* Escuela Médico Militar. México, D.F.

## Correspondencia:

Cap. 1/o. Pas. Méd. Arturo Iván Hernández-Bueno

Escuela Médico Militar, Cda. de Palomas S/N, Col. Lomas de Sotelo, C.P. 11200. Deleg. Miguel Hidalgo, México, D.F Tel.: 5520-2121

Recibido: Agosto 4, 2009.

Aceptado: Diciembre 22, 2009.

sivamente en el citoplasma de las células epiteliales sanas, respetando el núcleo celular. En las muestras de tejido con el diagnóstico de cáncer laríngeo se observó que la expresión de TLR7 se encuentra disminuida en comparación de la expresión de este mismo receptor en tejido sin cáncer.

**Discusión:** El sistema inmunitario es un sistema de reconocimiento que funciona como sensor en el organismo humano.

**Conclusiones:** Las células del epitelio laríngeo normal, expresan TLR7 de manera importante y las células cancerosas de laringe expresan menos TLR7. Es importante recordar que los ligandos de este receptor representan un campo importante de investigación y desarrollo de estrategias inmunoterapéuticas del cáncer laríngeo.

**Palabras clave:** Carcinoma escamoso de laringe, neoplasias de cabeza y cuello, receptores tipo Toll.

the cytoplasm of healthy epithelial cells, while respecting the cell nucleus. In tissue samples with the diagnosis of laryngeal cancer was observed that the expression of TLR7 is decreased in comparison with the expression of this receptor in tissue without cancer.

**Discussion:** The immune system is a recognition system that functions as a sensor in the human body.

**Conclusions:** The normal laryngeal epithelial cells express TLR7 significantly and larynx cancer cells express less TLR7. It is important to remember that this receptor ligands represent an important field of research and development of laryngeal cancer immunotherapeutic strategies.

**Key words:** Squamous cell carcinoma of the larynx, head and neck malignancies, Toll-like receptors.

## Introducción

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por alteraciones en las células, que tiene como resultado modificación en los oncogenes, en los genes supresores tumorales y en la estabilidad genética. Además, el microambiente celular tumoral, el estroma y el sistema inmunitario tienen una función muy importante en el desarrollo del cáncer.<sup>1</sup>

El cáncer localizado en laringe representa uno de los padecimientos más frecuentes en la patología otorrinolaringológica. La respuesta inmune al cáncer es poco entendida, así como la función de la inmunidad innata en el control de este padecimiento; se conocen moléculas que forman parte de esta rama de la respuesta inmune que pertenecen a la familia de los receptores de reconocimiento del patrón (PRR), de los cuales los receptores tipo Toll (TLR) representan una excelente oportunidad de estudio y del entendimiento del mecanismo de la inflamación en el desarrollo del cáncer de laringe.<sup>2</sup>

## Epidemiología del cáncer de cabeza y cuello

El cáncer es un problema de salud importante en nuestro país y una de las principales causas de morbilidad y mortalidad tanto en niños como en adultos. El cáncer se debe al descontrol en la proliferación y la propagación de clones de células transformadas.<sup>2</sup>

Las neoplasias en cabeza y cuello representan 17.6% (108,064) de la totalidad de las neoplasias malignas reportadas al Registro Histopatológico de Neoplasias en México (RHNM) en el año 2007. 62% son carcinomas cutáneos. El siguiente grupo está constituido por las neoplasias malignas de las vías aerodigestivas superiores, que representan 12% de las lesiones malignas en cabeza y cuello, con 2,269 casos que se distribuyen de la siguiente manera:

- Cáncer laríngeo 42%.
- Cáncer bucal 37%.
- Cáncer de fosas nasales y senos paranasales 9%.

- Cáncer de la bucofaringe 6%.
- Cáncer de la nasofaringe 3%.
- Cáncer de hipofaringe con 3%.<sup>3</sup>

El tercer grupo lo constituyen las neoplasias malignas de la glándula tiroides con 1,937 casos, que significa 10% de las neoplasias de la cabeza y el cuello.

Otras neoplasias menos frecuentes son los tumores cerebrales con 7.5%, los melanomas con 5%, los carcinomas de las glándulas salivales con 1.8% y los tumores malignos del ojo y sus anexos con 1.7%.

En relación con la mortalidad, las cifras absolutas son relativamente bajas; sin embargo, son muy importantes por la alta letalidad entre los afectados y por las graves secuelas estéticas y funcionales derivadas del tratamiento.

Específicamente se puede estimar que la letalidad por cáncer de la piel es de 5.4%, mientras que el melanoma alcanza 29% y para el cáncer de la glándula tiroides, ésta es de 24%. La letalidad estimada para el cáncer de vías aerodigestivas es la siguiente:

- Cavidad bucal 62.4%.
- Laringe 93%.
- Bucofaringe cerca del 100%.
- Hipofaringe 94%.
- Nasofaringe 83%.
- Fosnasales y senos paranasales 47%.

Aún considerando los sesgos, sorprende la letalidad del cáncer de laringe, mientras que las cifras asociadas al cáncer de hipofaringe es baja; esto nos hace suponer que una buena proporción de caso de cáncer de hipofaringe son diagnosticados como cánceres laríngeos y contribuyen, de manera ficticia, a una alta letalidad por cáncer laríngeo, de acuerdo con el RHNM (Registro Histopatológico de Neoplasias en México). En relación con el cáncer del tracto aerodigestivo superior la presentación en etapas avanzadas es una constante. Se ha reportado 65% de los casos acuden en etapas local y regionalmente avanzadas asociándose a

un pronóstico de supervivencia y funcionalidad muy pobre. La primera y más importante causa de cáncer de las vías aerodigestivas superiores es el hábito al tabaco.<sup>3</sup> En el Hospital Central Militar encontramos que en los años 2005, 2006 y 2007 el número de casos de neoplasias malignas de cuello y cabeza fue de 166, de las cuales 101 (61%) correspondieron a neoplasias malignas cutáneas, 23 (14%) a neoplasias malignas de laringe, 17 (10%) a neoplasias malignas de boca, 14 (8%) a neoplasias malignas de nariz y 11 (7%) a neoplasias malignas de tiroides (datos obtenidos por los autores, no publicados).

### Respuesta inmune al cáncer

El sistema inmunitario ha tenido tradicionalmente tres funciones importantes en la prevención del tumor:

- Primero, el sistema inmunitario protege al huésped de los tumores inducidos por virus, a través de la eliminación o supresión de la infección viral.
- Segundo, el tiempo de eliminación de patógenos y la rápida resolución de la inflamación pueden prevenir el establecimiento de un medioambiente inflamatorio conducente a la carcinogénesis.
- Tercero, el sistema inmunitario puede identificar y eliminar las células tumorales de acuerdo con la expresión de antígenos tumorales específicos o moléculas inducidas por el estrés celular.

### Inmunovigilancia

Este proceso identifica células precancerosas y/o cancerosas y las elimina antes que puedan causar daño. El sistema inmunitario reconoce y destruye células tumorales, estas propiedades fueron discutidas hace aproximadamente un siglo, y recientemente han sido revisadas en detalle.<sup>4</sup> A pesar de la inmunovigilancia, los tumores se desarrollan en la presencia de un sistema inmunitario funcional y, por lo tanto, el concepto actual de inmunoección es una explicación más completa de la función del sistema inmunitario en el desarrollo tumoral.

### Inmunoección

El concepto de inmunoección se refiere a un proceso dinámico que está dividido en tres fases llamadas: eliminación, equilibrio y escape.<sup>5</sup>

La fase de eliminación consiste en el concepto clásico donde el sistema inmunitario detecta y elimina células pre-tumorales y tumorales en estadios tempranos, que se han desarrollado como resultado de la falla de los mecanismos intrínsecos supresores tumorales. La fase de eliminación puede ser completa, cuando todas las células tumorales son eliminadas, o incompleta, cuando únicamente una porción de células tumorales se eliminan. En el caso de la eliminación parcial del tumor, la teoría de inmunoección define un estado temporal de equilibrio entre el sistema inmunológico y el tumor, por lo tanto, se desarrolla el tumor. Durante este periodo, las células tumorales permanecen quies-

centes o continúan evolucionando, acumulando cambios futuros (tales como mutaciones de DNA o cambios en su expresión génica) que pueden modular los antígenos tumorales específicos y antígenos inducidos por estrés, que ellas expresan. Como este proceso continúa, el sistema inmunitario ejerce una presión selectiva a través de la eliminación susceptible de clones tumorales. La presión ejercida del sistema inmune durante esta fase es suficiente para controlar la progresión tumoral, pero eventualmente, si la respuesta inmune falla para completar la eliminación del tumor, el proceso resulta en la selección de las variantes celulares tumorales que son capaces de resistir, evadir o suprimir la respuesta inmune antitumoral, iniciando la fase de escape.

Durante la fase de escape el sistema inmune no es capaz de contener el desarrollo tumoral y tiene como resultado el desarrollo tumoral progresivo.

Este nuevo concepto de inmunoección del cáncer es una interpretación más satisfactoria de los mecanismos que implican una función protectora del sistema inmunitario en el control tumoral.<sup>2</sup>

### Mecanismos inmunitarios para erradicar el cáncer

El principal mecanismo de inmunidad antitumoral es la eliminación de las células tumorales por los linfocitos T CD8+, reconociendo y eliminando las células malignas que expresan péptidos derivados de proteínas celulares mutantes o de proteínas víricas oncogénicas, que le son presentados a través de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I. Evidencias recientes sugieren que las células Th CD4+ protagonizan una función central en el inicio y mantenimiento de la respuesta inmune contra el cáncer. Éstas células secretan citocinas tales como IL-2 e IFN- $\gamma$ . El sistema inmunitario está compuesto por muchos tipos de células y mediadores que interactúan con células no inmunitarias y con otras redes complejas y dinámicas.

Las células NK destruyen varios tipos de células tumorales, en especial las que expresan de manera reducida las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC I) y que por tanto evitan la acción de los linfocitos T CD8+. Las células NK responden a la ausencia del MHC I porque el reconocimiento de dichas moléculas induce señales inhibitorias para dichas células. Además pueden actuar contra las células recubiertas con anticuerpos IgG a través de los receptores Fc (Fc  $\gamma$ RIII o CD16) a través del mecanismo llamado citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Ciertas citocinas, tales como los interferones y las interleucinas IL-2 e IL-12 potencian la capacidad tumoricida de las células NK.<sup>4</sup>

### Receptores tipo Toll

Toll-like receptors o receptores tipo Toll (TLRs) son proteínas transmembrana tipo I que han evolucionado de manera conservada entre insectos y humanos. La proteína Toll

fue primero identificada como una molécula esencial para el desarrollo embrionario en la mosca *Drosophilla* y posteriormente mostró ser la clave para la inmunidad antifúngica. Una familia homóloga de los receptores Toll existe en mamíferos, así que también los llamaron TLRs.

Basados en la similitud de las porciones citoplasmáticas (llamados Toll-IL-1R o dominio TIR), los TLRs están relacionados a los receptores de IL-1 (IL-1Rs). Sin embargo, las porciones extracelulares de TLRs e IL-1Rs son completamente diferentes: La porción extracelular de los TLRs contienen repeticiones ricas en leucina, mientras IL-1Rs contienen tres dominios parecidos a inmunoglobulina. Trece TLRs han sido identificados; TLR 1 al 9 son comunes para el hombre y el ratón, mientras TLR 10 es sólo funcional en humanos y TLR11, 12 y 13 han sido encontrados solo en ratones.

Así TLR1, TLR2 y TLR 6 median el estímulo celular después de la interacción con peptidoglicano y otros productos microbianos, TLR3 con RNA de doble cadena (dsRNA), TLR4 con lipopolisacárido (LPS), TLR5 con flagelina, TLR7 y TLR8 con imidiazquinolonas y TLR9 con DNA CpG desmetilados. Los TLRs están diferencialmente expresados en los diversos tipos de DCs y en monocitos.

Los TLRs 1, 2, 4, 5 y 6 son muy parecidos en cuanto a la especialización en el reconocimiento principal de productos que son únicos en las bacterias y no los producidos en el huésped. Su detección, sin embargo, permite una discriminación entre lo propio y lo no propio.

TLR3, 7, 8 y 9, en contraste se especializan en la detección viral y el reconocimiento de ácidos nucleicos. Éstos están localizados en compartimentos intracelulares llamados endosomas.<sup>6</sup>

### Toll like receptor 7

De los diez TLRs identificados en humanos, TLR7 es referido como un TLR intracelular, esta expresado sobre las membranas de los endosomas y reconoce nucleósidos, nucleótidos y oligo polinucleótidos derivados de patógenos intracelulares virales y bacterianos.<sup>7</sup> TLR7 es un receptor para ssRNA de cadena simple y nucleósidos.<sup>8-10</sup> TLR7 también se expresa en células B y células dendríticas plasmocitoides.

#### Agonistas de TLR7

Los ssRNA sintéticos y virales actúan como agonistas de TLR7,<sup>9,10</sup> ciertos nucleósido análogos tales como loxoribina, 7-thia-8-oxo-guanosina y 7-deasaguanosina también activan TLR7 en concentraciones mayores a 100  $\mu$ M.<sup>8</sup>

Compuestos hechos a base de imidazoquinolona también actúan como agonistas de TLR 7<sup>8</sup> e interactúan con las vías de señalización del receptor de adenosina para inducir respuestas inmunitarias.<sup>11</sup> Estudios recientes han mostrado que el RNAs sintético que actúa como agentes de control de expresión de genes siRNA (RNA interferencia pequeño) también induce TLR3,<sup>12</sup> TLR7<sup>13-15</sup> y median respuestas inmu-

nes, el reconocimiento de RNA por el TLR7 depende de la composición de los nucleótidos.

El RNA es rápidamente degradado por las nucleasas in vivo, lo cual limita su uso como un inmunomodulador. La degradación de las nucleasas del RNA ocurre primariamente desde 3'-terminal por exonucleasas, con la degradación en sitios internos por medio de sitios no específicos y específicos de los dinucleótidos de las endonucleasas, y en menor grado del extremo 5'-terminal. Todos los estudios reportados han usado la composición de ssRNA basado en agonistas de TLR7 con lípidos para incrementar la estabilidad de las nucleasas en la unión y desarrollo.<sup>16</sup>

Lan y cols.<sup>17</sup> han reportado recientemente que el uso del RNAs unidos a sus extremos 3' terminal para prevenir la degradación de la 3 exonucleasa referida como compuestos SIMRA (estabilizador del RNA inmunomodulador).

Los compuestos SIMRA son más estables en el suero humano que en ssRNA. También se han observado que la estabilidad de ssRNA depende de la composición de nucleótidos: como dinucleótidos específicos como UA y CA son susceptibles a la rápida degradación por endonucleasas<sup>17</sup> evitando estas partículas de dinucleótidos ayuda a la estabilidad de ssRNA contra estas endonucleasas.

### Expresión de los TLR en células tumorales

Existen evidencias cada vez mayores de que las células de diferentes tipos de cáncer expresan uno o varios tipos de TLRs. La importancia de este fenómeno está lejos de ser esclarecida; sin embargo, existen múltiples líneas de evidencia que sugieren el impacto biológico de los TLRs en la expresión, crecimiento y supervivencia de las células tumorales. Por ejemplo: Hassan y cols.<sup>18</sup> han demostrado que las células del neuroblastoma humano expresan una forma intracelular de TLR 4, más allá de esto, las células muestran factores de expresión requeridos para la respuesta de LPS como la de CD14, MyD88 y MD2, lo cual sugiere que la expresión de los TLR 4 es funcional.

He y cols.<sup>19</sup> han demostrado una función negativa de la expresión de los TLR 4 en líneas de células tumorales de cáncer de pulmón en humanos. Los agonistas de los ligandos de LPS en las células antes mencionadas, producen citocinas inmunosupresoras como TGF- $\beta$  y resistencia al TNF- $\alpha$  y su vía induce apoptosis.

Existe también evidencia de que las bacterias presentes en el microambiente del tumor pueden promover el crecimiento de este mediante la señalización de los TLRs.

Huang y cols.<sup>20</sup> han demostrado que cuando se presenta *Listeria monocytogenes* en el microambiente de tumores de gran tamaño, acelera el crecimiento del tumor mediante la vía de señalización de TLR2.

Aparentemente el mismo o un mecanismo similar se presenta en pacientes con carcinoma gástrico de pacientes, debido a la interacción de las células que expresan TLRs con la bacteria *Helicobacter pylori*, en contraste a las situaciones normales en las que la bacteria comensal y la mucosa gas-

trointestinal mantienen la homeostasis mediante los TLRs.<sup>21,22</sup> De igual manera, las células de mieloma humano expresan múltiples TLRs, como TLR 1, 7 y 9. Su activación por los ligandos bacterianos y la bacteria infectante promueve el crecimiento tumoral y escapa al tratamiento con terapias convencionales.<sup>23</sup>

Kelly y cols.<sup>24</sup> han demostrado que MyD88+ en líneas celulares de cáncer de ovario, difieren de aquellas con MyD88-. La señalización de LPS en las células de cáncer MyD88+, aparte de la producción de citocinas proinflamatorias, ayudan a la inducción del crecimiento tumoral.

La expresión de MyD88 ha sido asociada a drogas anticancerígenas, resistencia a paclitaxel y la expresión de proteínas antiapoptóticas. No fue el caso de las células probadas con MyD88-. Esto sugiere que MyD88 es una proteína adaptadora que se expresa en células cancerosas y es de importancia crucial en la biología del tumor.

Kundu y cols.<sup>25</sup> han demostrado que células de epitelio de próstata inmortalizadas, expresan tanto TLR4 como TLR9, exhibiendo su proliferación en presencia del LPS y CpG DNA.

Estas células estimuladas han demostrado ser menos susceptibles a la apoptosis inducida por TNF  $\alpha$  y a la muerte celular gracias a las altas concentraciones de LPS. Otros autores como Ilvesaro y cols.<sup>26</sup> han mostrado evidencias, de que los agonistas de TLR9, un ejemplo son los oligonucleótidos CpG desmetilados (CpG-ODN), promueven la actividad de la metaloproteínasa-13 de matriz (MMP-13) provocando migración de las células que expresan TLR 9 en cáncer de próstata en humanos. Tanto los LPS y el CpG ODN son bien conocidos como moléculas asociadas a patógenos como los que residen en el aparato genitourinario como *E. coli* y algunos virus DNA (como VPH). Esta información demuestra que los patógenos frecuentemente encontrados en estos medios pueden ocasionar transformación maligna y diseminación de las células cancerígenas.

Por lo que se ha encontrado que no sólo el CpG ODN, tanto natural como sintético, puede funcionar como un adyuvante para vacunas en enfermedades infecciosas, si no que también para el tratamiento del cáncer.<sup>27</sup>

La función de los TLRs expresados en células tumorales, mediante la evasión del sistema inmune fue elegantemente demostrado en experimentos.<sup>28</sup> Estos autores han demostrado en muchos tumores de ratones y sistemas de líneas celulares tumorales, que la activación de los TLR4 mediante la unión de los LPS, desencadenan inmunosupresión *in vitro*.

Este efecto inhibitorio de TLR4 puede ser revertido tanto por de RNA de interferencia corto (siRNA) y péptidos.

La estimulación de TLR 4 en células tumorales resulta en la síntesis de óxido nítrico y de muchas citocinas proinflamatorias como IL-6 e IL-12. Tanto el óxido nítrico como IL-6 han demostrado inhibir la proliferación de las células T y la actividad de las células NK. El bloqueo de la señalización de las TLR4 en el tumor mediante siRNA o por la partícula del péptido TLR 4 ayuda a la supervivencia de las células tumorales en ratones. Estos resultados demuestran que, la estimulación de los TLRs pueden ayudar a la progre-

sión tumoral y se encuentran en estudio métodos específicos para revertir este efecto.

Por otro lado, Salaun y cols.<sup>29</sup> han demostrado que TLR 3 en células de cáncer de mama en humano, pueden dirigir a estas células a apoptosis. El dsRNA sintético, agonista de TLR 3, induce conjuntamente a la apoptosis de líneas celulares 3 y 4 de cáncer de mama en humano.

El TLR 3 expresado en las células tumorales también fue capaz de dirigir estas células a la apoptosis, cuando se estimulaban con interferón tipo I. Estos datos son importantes pues proporcionan evidencia de que las células cancerosas pueden ser identificadas por un factor endógeno. La expresión de los TLRs funcionales ha sido demostrada en células de diferentes cánceres humanos, incluyendo, al carcinoma de células escamosas del pulmón que expresa TLR 9.<sup>30</sup>

Jan Zeromski y cols. han demostrado la expresión de TLR2, TLR3 y TLR4 en células tumorales de carcinoma laríngeo, usando cortes de tejido congelado, anticuerpos apropiados, bloques de péptidos específicos e inmunohistoquímica.<sup>31</sup> Este tipo de tumores en su gran mayoría se origina de células escamosas, a menudo de epitelio queratinizado, los queratinocitos han demostrado expresar un tipo funcional de TLR.<sup>32</sup> También es interesante saber que los TLRs han sido coexpresados con los antígenos HLA-DR, lo cual nos sugiere la función de los TLRs en la presentación de antígenos tumorales. Los experimentos hechos en líneas celulares de tejidos cultivados de HNSCC encontraron una función biológica inversa del TLR4 y 9. La expresión de TLR4 parece influir en la progresión tumoral, mientras que el TLR 9 sensibiliza las células tumorales mediante apoptosis inducida por medicamentos.

### **Utilización de los ligandos de TLR-7 en el tratamiento y prevención del cáncer**

La respuesta clínica al tratamiento tópico con imiquimod (Aldara, crema al 5%) ha sido efectivo, tanto para los tumores primarios de la piel como para las metástasis cutáneas.<sup>33</sup>

En estos estudios, no fueron adicionados antígenos asociados al tumor (TAAs) y los efectos inmunopotenciadores de imiquimod fueron suficientes para activar una respuesta antitumoral. Posteriormente imiquimod ha mostrado ser efectivo para el tratamiento de la queratosis actínica (AKs).

Estas lesiones premalignas aparecen como parches de piel rugosos y secos, y son asociados a daño causado por la radiación ultravioleta (UV). Si el daño del DNA resulta en la inhibición de la apoptosis de las células actínicas dañadas, estas propician el desarrollo de carcinoma de células escamosas. Torres y cols. han evaluado los cambios en la expresión génica que ocurren en la piel sin lesiones expuesta al sol y en lesiones con AK.

Ellos encontraron que el tratamiento con imiquimod estuvo asociado con la reversión total o parcial de la expresión aberrante de algunos genes en AK, por lo tanto, demostrando la capacidad de imiquimod para prevenir el desarrollo del cáncer. Estos estados fueron confirmados por otros auto-

res demostrando que el tratamiento con imiquimod resulta en la eliminación de lesiones de AK.<sup>34-38</sup>

Debido a que los agonistas de TLR-7 son intensos activadores inmunitarios que además son capaces de inducir una respuesta inmune anti-TAA, también tienen el riesgo de inducir enfermedades autoinmunes contra antígenos propios. Como revisó Krieg y Vollmer<sup>39</sup> no existen reportes sobre la inducción de una enfermedad autoinmune sistémica a través del tratamiento tópico por imiquimod. Hay pocos casos reportados en donde el tratamiento tópico con imiquimod indujo enfermedades autoinmunes localizadas en la piel como el vitíligo y pénfigo<sup>40,41</sup> y exacerbaron la psoriasis mediada por complejos inmunes.<sup>42</sup> Así que el imiquimod no agravó el vitíligo persistente y fue entonces en el tratamiento de lupus eritematoso discoide.<sup>43</sup>

En conclusión, los agonistas TLR7 poseen la capacidad de facilitar la inducción de una respuesta inmune antitumoral efectiva sin inducir enfermedad autoinmune sistémica.

A partir de los datos prometedores de la terapia con imiquimod, otros agonistas sintéticos de TLR-7, han sido desarrollados para mejorar las propiedades de estos agonistas en términos de su farmacocinética, toxicidad, cantidad de citosinas inducidas y especificidad de TLRs. Estos agonistas (como ssRNA, R-848 y 852A) no han sido probados como IRMs en modelos preclínicos<sup>44</sup> y en ensayos clínicos, hasta ahora los agonistas de TLR-7 y han sido predominantemente administrados vía tópica debido a sus efectos colaterales reportados después de su administración terapéutica, oral y sistémica con IRMs.<sup>45</sup>

La reducción transitoria de los niveles virales después de la administración vía oral de imiquimod a pacientes con hepatitis C crónica, fueron acompañados de efectos adversos similares a aquellos observados con IFN- $\alpha$  exógeno (síntomas parecidos a la influenza como fiebre, malestar y náuseas).<sup>46</sup> La administración sistémica de resiquimod está asociada con insuficiencia inmune local. En reportes recientes por los grupos de Miller y Urosevich<sup>47,48</sup> la administración intravenosa de agonistas de TLR-7 (852A) fueron probados en pacientes con diferentes tipos de tumores. Estos agonistas TLR-7 fueron bien tolerados con efectos adversos mínimos y comprobando que el 852A induce activación inmune sistémica.

No obstante, la administración intravenosa del agonista específico de TLR-7 852A no demostró actividad antitumoral intensa contra las células CLL,<sup>49</sup> aunque células leucémicas que infiltraron la piel en pacientes con células CLL, desaparecieron después del tratamiento con imiquimod,<sup>50</sup> en conclusión, la alteración de la estructura de los agonistas sintéticos de TLR-7 pueden resultar en moléculas con cualidades farmacológicas que las hacen apropiadas para el tratamiento de tumores y tumores de piel. Sin embargo la vía de administración y la elección de los agonistas de TLR-7 pueden ser factores importantes para definir el resultado de la administración de los agonistas de TLR-7 sobre la supervivencia tumoral.<sup>51</sup>

## Justificación

Debido a la importancia de la respuesta de la inmunidad innata a través de la activación de los TLRs y su función en las células cancerígenas, el estudio de TLR7 y sus ligandos como adyuvante para el desarrollo de inmunoterapia efectiva contra esta patología, así como los mecanismos inmunitarios moleculares involucrados, representan una importante línea de investigación.

## Planteamiento del problema

El sistema inmunitario protagoniza una función importante en la eliminación del mecanismo del cáncer, así que la inmunidad innata a través del receptor Tipo Toll 7, estaría involucrado en este proceso, por lo que nos planteamos la siguiente pregunta:

¿Cuál es la expresión de TLR 7 en tejidos tumorales de laringe con el diagnóstico de cáncer escamoso provenientes de pacientes del Hospital Central Militar?

## Objetivo general

Determinar la expresión de TLR7 en tejido con diagnóstico histopatológico de laringe de pacientes del Hospital Central Militar.

## Objetivos específicos

1. Determinar la expresión de TLR7 en tejido sano de laringe mediante la técnica de inmunohistoquímica.
2. Determinar la expresión de TLR 7 en tejido con diagnóstico histopatológico de cáncer escamoso de laringe mediante la técnica de inmunohistoquímica.
3. Comparar la expresión de TLR 7 en tejido sano y tejido con diagnóstico histopatológico de cáncer escamoso de laringe del Hospital Central Militar.

## Hipótesis

La expresión de TLR7 en tejido con diagnóstico histopatológico de cáncer escamoso de laringe de pacientes del Hospital Central Militar se encuentra disminuida en relación al tejido de laringe sana.

## Metodología

Se llevó a cabo un estudio retrospectivo, longitudinal de tipo descriptivo en 25 pacientes del Hospital Central Militar del Archivo de Patología de muestras patológicas, diagnosticadas como cáncer escamoso de laringe para la estudio del mismo.

## Criterios de inclusión

Muestras de tejidos con el diagnóstico histopatológico de cáncer escamoso de laringe.

**Criterios de exclusión**

Muestras de tejido que no tengan el diagnóstico histopatológico de cáncer escamoso de laringe.

Cantidad de muestra insuficiente para la realización de la inmunohistoquímica.

*Variables a estudiar:* Variable dependiente: Es la expresión de TLR7. Variable independiente: muestras de tejido con diagnóstico histopatológico de carcinoma escamoso de laringe de pacientes del Hospital Central Militar.

*Soluciones utilizadas:* Solución recuperadora de antígeno: 10 x Inmuno Retrifer: 50 mL; agua destilada: 950 mL. Solución de lavado TBS: agua destilada: cantidad/litro 700 mL. TRIS: concentración 50 mM; cantidad/litro 6.05 g/lit. NaCl: concentración 150 mM8.76; cantidad/litro 6.05 g/lit. pH concentración 7.5; cantidad/litro ajustar pH con HCL concentrado. Agua destilada: cantidad/litro 1 lt. *Dilución del anticuerpo primario:* anti TRL7 humano (1:100). Diluyente para anticuerpo primario (PBS sol. salina de fosfato estabilizadora a ph 7.4 y suero normal de cabra) 0.99 mL. *Solución del anticuerpo secundario:* Mouse/rabbit inmunodetector biotin link. *Solución del inmunodetector:* Mouse/rabbit inmunodetector HRP label. *Solución de revelado:* Diaminobencidina (DAB) por cada muestra 30 µL.

El procedimiento que se utilizó para realizar la técnica fue desparafinar. Para desparafinar los cortes se calentaron a 70 °C durante 15 minutos en un horno de desecación y se sometieron a tres baños en xilol al 100% de 5 minutos cada uno. Se removió el xilol y se deshidrató el tejido con tres baños de etanol-xilol por 3 minutos, dos baños de alcohol etílico al 100% por tres minutos, un baño de etanol a concentraciones de 96, 80 y 70%, posteriormente se lavaron las laminillas en agua bidestilada y se colocaron en un frasco de copplin con TBS durante 10 minutos.

**Recuperación antigénica**

Se retiro TBS y se lavó con agua destilada y se colocaron las laminillas en solución InmunoRetriver10x durante 10 minutos en olla de presión a 90 °C.

Se bloqueó la avidina colocando 30 microlitros de avidina (1:1000 en pbs ) en cada muestra de tejido y se incubó durante 15 minutos decantar y se lavó con TBS, posteriormente se bloqueó la biotina colocando 30 microlitros de biotina (1:1000 en pbs ) en cada muestra de tejido y se incubó durante 15 minutos.

Se lavaron las laminillas con TBS cada una durante 10 segundos.

Se bloqueó la actividad endógena de la peroxidasa colocando las laminillas en solución de peróxido de hidrogeno al 20% en agua destilada dentro de un frasco de copplin durante 5 minutos.

Se incubó por 15 minutos con 30 microlitros de solución bloqueadora p. i. cada muestra de tejido.

Se decantó la solución restante, agregamos el anticuerpo primario (1:100 a un pH de 7) diluido en TBS con suero de cabra al 3% durante 30 minutos. Se lavaron las laminillas con TBS cada una durante 10 segundos.

Posteriormente se colocó 30 µL de polidetector en cada muestra de tejido y se dejó reposar durante 10 minutos.

Después Se colocaron 30 µL de POLIDETECTOR-HRP en cada muestra de tejido y se dejó reposar durante 10 minutos.

Se agregaron 30 µL por cada muestra de solución de revelado se incubó 5 minutos, posteriormente se enjuagó con agua corriente y agua bidestilada. Se colocaron las laminillas en un recipiente con hematoxilina durante tres minutos.

Finalmente se deshidrató el tejido con baños de alcohol etílico de graduación progresiva de 70, 80, 96 y 100% durante cinco minutos cada uno y se colocaron las muestras en xilol. Se agregó resina sintética (entellan) a cada una de las laminillas y se les colocó un cubreobjetos.

**Análisis estadístico**

Se utilizaron los programas Microsoft Office Excel 2007, Graph Pad Software Inc. Versión 3.02. Las imágenes se capturaron con el microscopio con focal Zeiss LSM 5 Pascal Axiovert 200M para su análisis por campo e interpretación de resultados con el procesador de imágenes KS300.

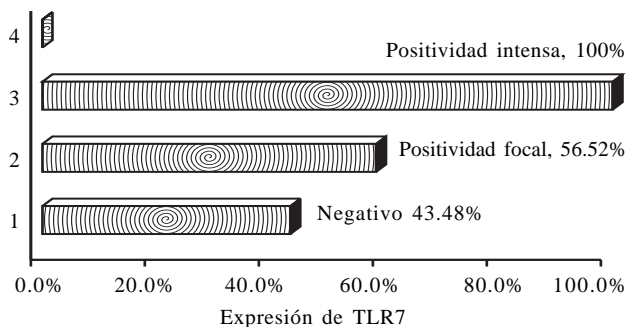
**Resultados**

Se obtuvieron 25 muestras de tejido pacientes con el diagnóstico histopatológico de carcinoma escamoso de laringe dos muestras de tejido laríngeo sano como control, de éstas, 13 con el diagnóstico de cáncer laríngeo, cinco con el diagnóstico de cáncer de cuerdas vocales, dos con el diagnóstico de cáncer en glotis, uno con el diagnóstico de cáncer supraglótico, uno con el diagnóstico de cáncer en cartílago aritenoides y uno con el diagnóstico de cáncer en el seno piriforme (*Cuadro 1 y Figura 1*).

La técnica de inmunohistoquímica se realizó en el laboratorio de Biología Celular y Tisular de la Torre de Laboratorios de la Escuela Médico Militar y en el área de immuno-

**Cuadro 1.** Muestras estudiadas.

Diagnósticos histopatológicos de las muestras estudiadas	
No. de muestras	Diagnóstico histopatológico
23	Cáncer laríngeo
2	Laríngeo sana



**Figura 1.** Porcentaje de la expresión de TLR.

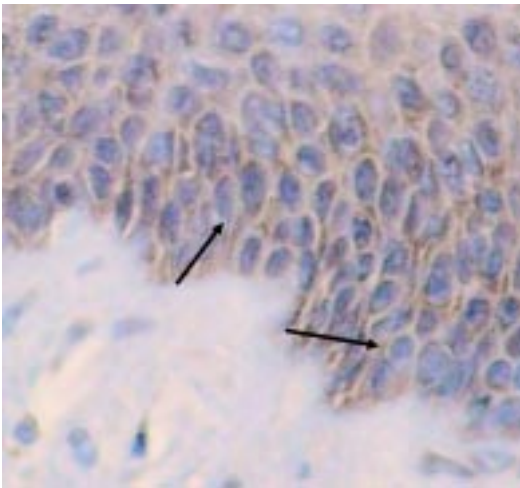


histoquímica del Servicio de Patología del Hospital Central Militar, encontrado que la concentración adecuada del anticuerpo primario anti-TLR7 humano, fue de 1:100. En las muestras de tejido laríngeo sano se observó que la expresión de TLR7 se encuentra exclusivamente en el citoplasma de las células epiteliales sanas, respetando el núcleo celular (Figura 2). En las muestras de tejido con el diagnóstico de cáncer laríngeo se observó que la expresión de TLR7 se encuentra disminuida en comparación de la expresión de este mismo receptor en tejido sin cáncer. El epitelio ductal de las glándulas mucosas sanas resultó positivo para TLR7 (Figura 3). El tejido con diagnóstico histopatológico de carcinoma escamoso de laringe no expresó TLR7 (Figura 4).

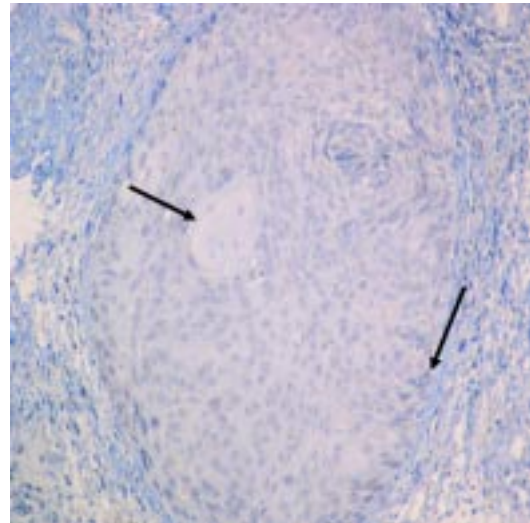
El tejido con el diagnóstico histopatológico de cáncer de células escamosas de laringe demostró positividad focal en citoplasma (Figura 5).

En la figura 1 se aprecia la positividad difusa e intensa, la cual representa una expresión de TLR 7 cualitativamente importante en color café, así como la positividad focal que representa una expresión de TLR 7 cualitativamente disminuida de color café, finalmente el Negativo representa una expresión nula de TLR 7.

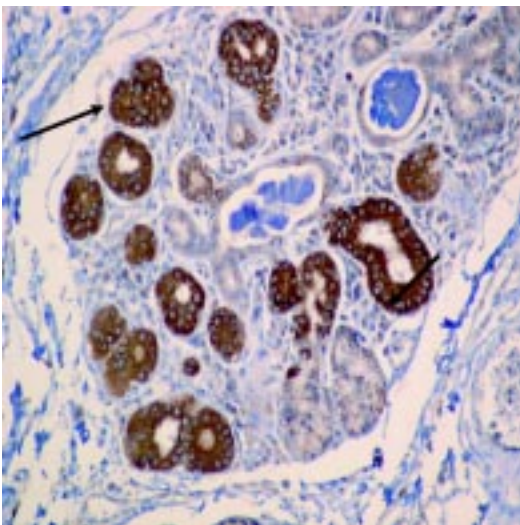
Las figuras 6-7 muestran mucosa de laringe sana con técnica inmunohistoquímica en contraste con células escamosas como se muestra en las figuras 8-13.



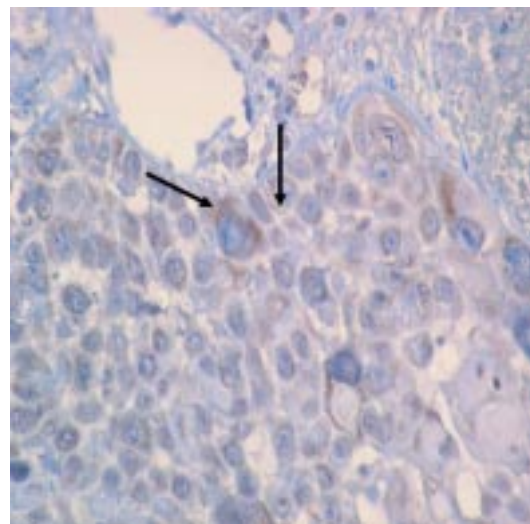
**Figura 2.** Mucosa de laringe sana con la técnica de inmunohistoquímica con una resolución de (40x) donde se observa epitelio escamoso pseudoestratificado, células con núcleos regulares equidistantes e isomorfos, sin datos de mitosis, positividad del anticuerpo TLR 7 en citoplasma teñido en color café, respetando los núcleos teñidos en azul.



**Figura 4.** Tejido con la técnica de inmunohistoquímica con una resolución de (40x) donde se observa nido de células cancerosas en laringe con núcleos dismórficos, polimorfismo celular, patrones de células atípicas, células fusiformes, con positividad focal a TLR 7.

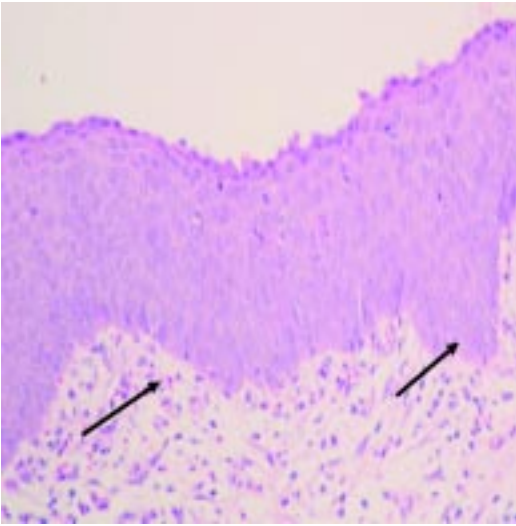


**Figura 3.** Tejido con la técnica de inmunohistoquímica con una resolución de (20x) donde se observa epitelio ductal de laringe sana con una positividad intensa y difusa a TLR 7.

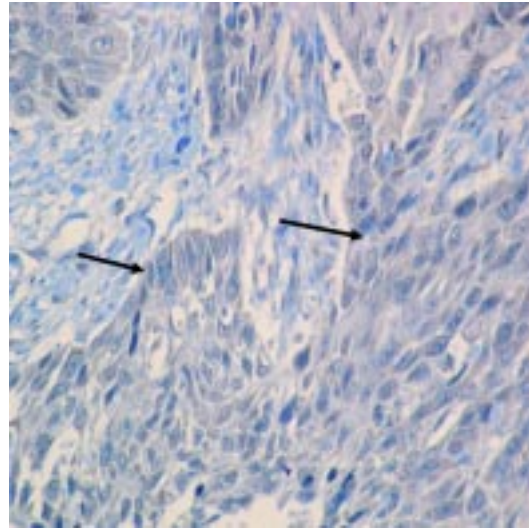


**Figura 5.** Tejido con la técnica de inmunohistoquímica con una resolución de (40x) donde se observa nido de células cancerosas en laringe con núcleos dismórficos, polimorfismo celular, patrones de células atípicas, células fusiformes, con positividad focal a TLR 7.

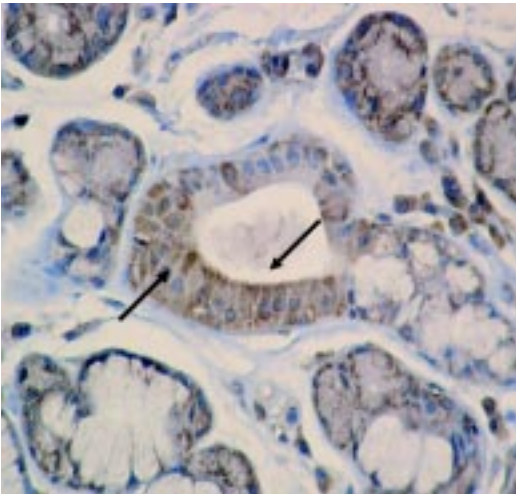




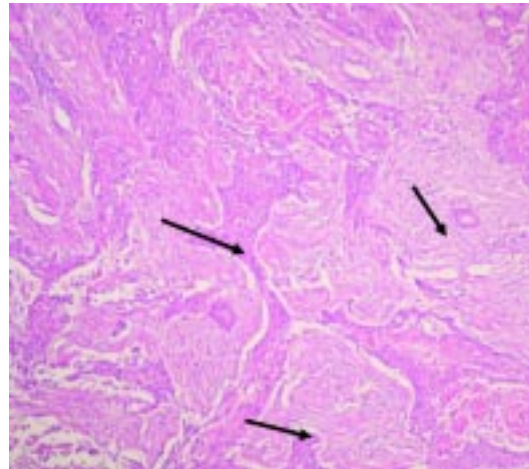
**Figura 6.** Tejido con la técnica de hematoxilina y eosina con una resolución de (20x) donde se observa mucosa de laringe sana con epitelio escamoso pseudoestratificado, células con núcleos regulares equidistantes e isomorfos, sin datos de mitosis, sin cambios en el estroma.



**Figura 8.** Tejido con la técnica de inmunohistoquímica con una resolución de (40x) donde se observa carcinoma de células escamosas de laringe con núcleos dismórficos, polimorfismo celular, patrones de células atípicas, células fusiformes, con negatividad a TLR 7.



**Figura 7.** Tejido con la técnica de inmunohistoquímica con una resolución de (40x) donde se observa epitelio ductal de laringe sana con una positividad a TLR 7 intensa y difusa sin pegado inespecífico en citoplasma con núcleos negativos.



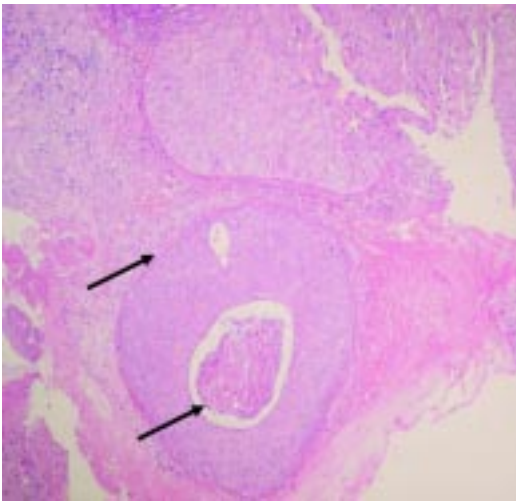
**Figura 9.** Tejido con la técnica de hematoxilina y eosina con una resolución de (20x) donde se observa carcinoma de células escamosas de laringe, núcleos dismórficos, polimorfismo celular, patrones de células atípicas, células fusiformes, nidos de células cancerosas y células queratinizadas.

En la figura 14 se puede observar que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los pacientes con resultado negativo de acuerdo con el área anatómica de carcinoma laríngeo, a pesar de haber sido más frecuente el carcinoma epidermoide de cuerda vocal izquierda.

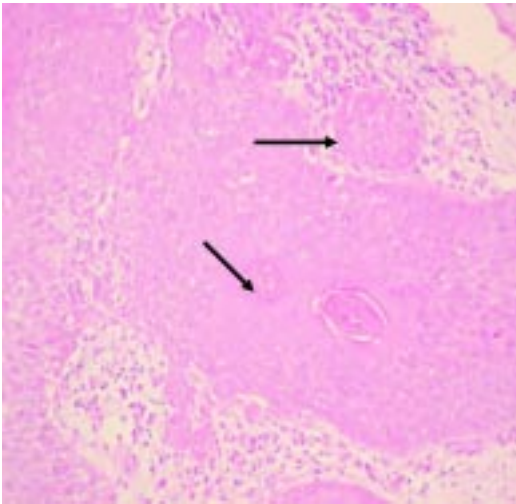
En la figura 15 se muestra que en los individuos con positividad focal de acuerdo con el área anatómica de carcinoma; destacó la frecuencia de presentación de carcinoma epidermoide de laringe, sobre las otras áreas anatómicas de carcinoma laríngeo y el cual, de acuerdo con el análisis estadístico, presenta diferencia estadísticamente significativa con respecto a las otras áreas anatómicas de presentación.

Para el análisis estadístico de este estudio se aplicó la prueba de hipótesis para la diferencia entre las proporciones de dos poblaciones (*Figura 16*).

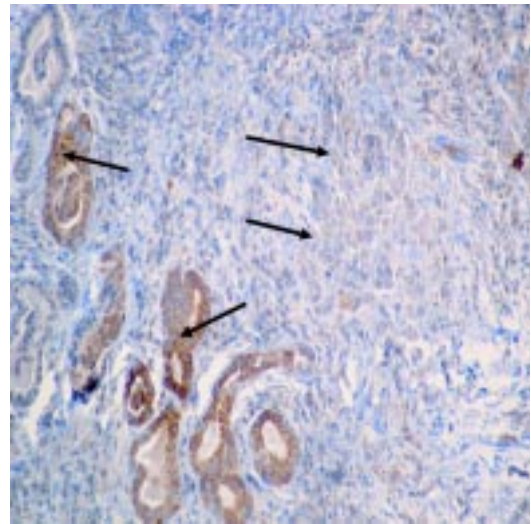
En la *figura 17* se puede apreciar que las muestras de individuos con expresión de TLR7 diagnosticados con carcinoma de laringe resultaron con positividad focal 56.52% de los individuos estudiados y el total de individuos sanos los cuales presentaron positividad intensa, al realizar la comparación de estos dos grupos por medio del análisis estadístico encontramos diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, lo que nos permite rechazar la hipótesis nula y confirmar la hipótesis de este trabajo con lo que se puede concluir que la expresión de



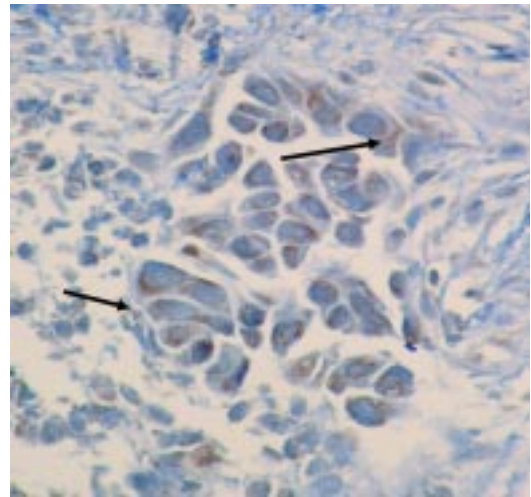
**Figura 10.** Tejido con la técnica de hematoxilina y eosina con una resolución de (20x) donde se observa carcinoma de células escamosas de laringe, núcleos dismórficos, polimorfismo celular, patrones de células atípicas, células fusiformes, nidos de células cancerosas y células queratinizadas.



**Figura 11.** Tejido con la técnica de hematoxilina y eosina con una resolución de (20x) donde se observa carcinoma de células escamosas de laringe, núcleos dismórficos, polimorfismo celular, invasión del estroma, nidos de células cancerosas y células queratinizadas.



**Figura 12.** Microfotografía comparativa con técnica de inmunohistoquímica, resolución de (20x ) donde se observa negatividad a TLR 7 en células cancerosas de laringe con núcleos dismórficos, polimorfismo celular, patrones de células atípicas, células fusiformes y glándulas mucinosas sanas con núcleos regulares equidistantes e isomorfos, sin datos de mitosis, positividad del anticuerpo TLR 7 en citoplasma.



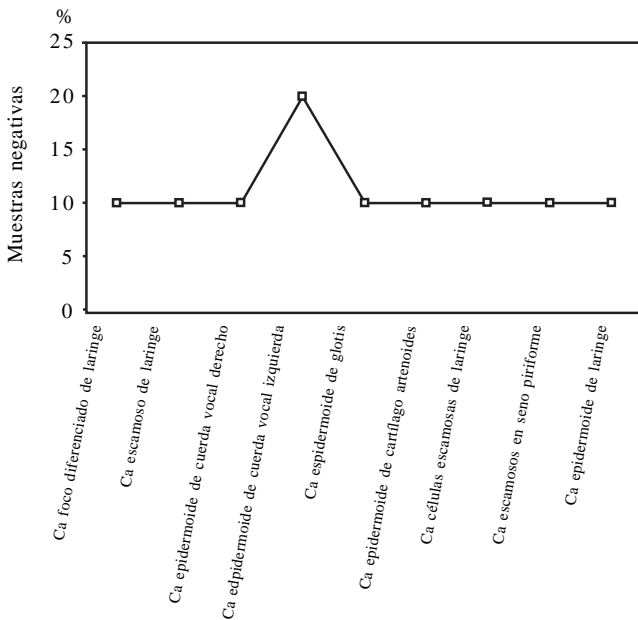
**Figura 13.** Tejido con la técnica de inmunohistoquímica con una resolución de (40x) donde se observa nido de células cancerosas en laringe con núcleos dismórficos, polimorfismo celular, patrones de células atípicas, células fusiformes, con negatividad a TLR 7.

TLR7 en tejido con diagnóstico histopatológico de carcinoma de laringe en pacientes del Hospital Central Militar se encuentra disminuida en relación al tejido de laringe sana.

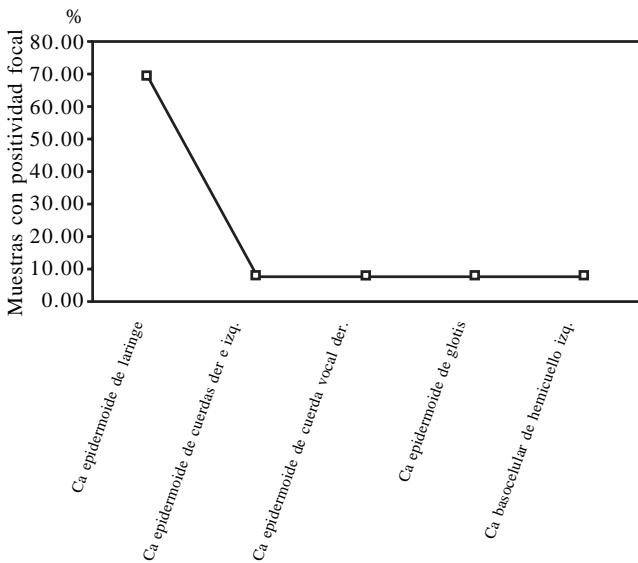
En la *figura 18* se observa que a pesar de que 43.48% de las muestras con carcinoma, mostraron falta de expresión de TLR 7 y que aun cuando fue mayor el porcentaje de pacientes que sí mostraron expresión de TLR 7 con presencia de positividad focal, al efectuar análisis estadístico entre ambos grupos no se encontró ninguna diferencia significativa lo que nos hace pensar que la expresión de TLR7 aun siendo positiva es poco significativa como hallazgo, ya que en este caso se acepta la H0 y el valor de  $p = 0.842$

## Discusión

El sistema inmunitario es un sistema de reconocimiento que funciona como sensor en el organismo humano, La respuesta inmunitaria protagoniza una función importante en el control de esta enfermedad, así que la rama de la inmunidad innata no ha sido bien estudiada en el control y eliminación de esta enfermedad. La respuesta inmune innata a través de los PRRs podría ofrecer una herramienta para la inducción de la respuesta inmune adaptativa. Las células cancerosas por sí mismas podrían ser un disparador de los componen-

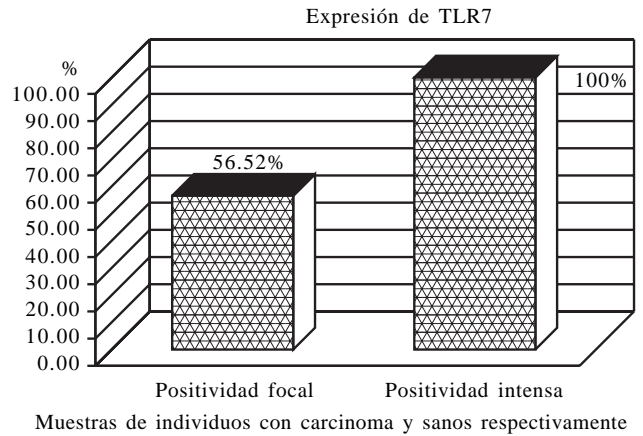


**Figura 14.** Muestras con negatividad ATR 7.  
 $\alpha = 0.05$  el valor crítico de  $Z = 1.645$ . Valor de  $Z = 0.000$   $P = 1.000$ .  
 Desviación Estándar = 0.160. Intervalo de Confianza al 95% = -0.213 a 0.413. Por lo que se acepta la  $H_0$

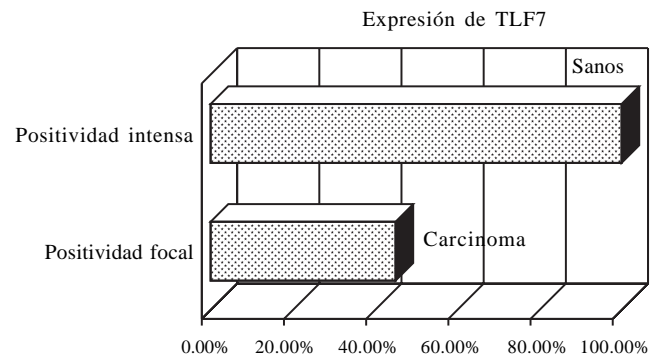


**Figura 15.** Muestras con positividad focal.  
 $\alpha = 0.05$  el valor crítico de  $Z = 1.645$ . Valor de  $Z = 2.822$   $P = 0.005$ .  
 Desviación Estándar = 0.191. Intervalo de Confianza al 95% = 0.241 a 0.989. Por lo que se rechaza la  $H_0$ .

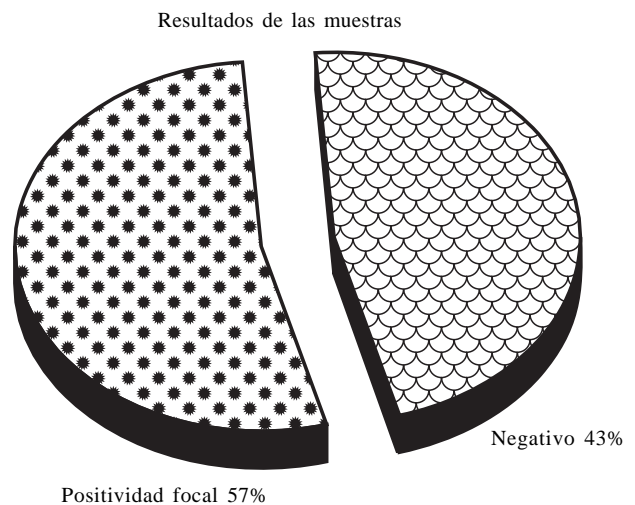
tes de la respuesta del sistema inmunitario innato a través de los TLRs. TLR 7 es un receptor que se encuentra en endosomas citoplasmáticos que al ser estimulado mediante sus ligandos, ya sea naturales como el RNA de cadena simple de origen viral o con ligandos sintéticos como el imiquimod (Aldara® Crema al 5%) induce vías de señalización hacia los genes que codifican para el IFN tipo I y algunas citocinas proinflamatorias, hasta el momento no existen estudios que demuestren la expresión de este receptor en célu-



**Figura 16.** Comparación de positividad focal e intensa.  
 $H_0$ : La proporción en la expresión de TLR7 es menor en muestras de individuos sanos que en pacientes con carcinoma de laringe.  
 $H_A$ : La proporción en la expresión de TLR7 es mayor en muestras de individuos sanos que en pacientes con carcinoma de laringe.  
 $\alpha = 0.05$  el valor crítico de  $Z = 1.645$ . Valor de  $Z = 3.217$   $P = 0.001$ .  
 Desviación Estándar = 0.122. Intervalo de Confianza al 95% = -0.673 a -0.196. Por lo que se rechaza la  $H_0$ .



**Figura 17.** Positividad en muestras sanas y con carcinoma.



**Figura 18.** Porcentaje de la expresión de TLR 7.  
 $\alpha = 0.05$  el valor crítico de  $Z = 1.645$ . Valor de  $Z = 0.199$   $P = 0.842$ .  
 Desviación Estándar = 0.122. Intervalo de Confianza al 95% = -0.543 a 0.282. Por lo que se acepta la  $H_0$ .



las cancerosas provenientes de muestras de pacientes con el diagnóstico de cáncer escamoso de laringe. Modelos *in vitro*, han demostrado que líneas celulares cancerosas a través de la aplicación ligandos de TRL7 como el imiquimod inducen directamente apoptosis,<sup>34-38</sup> además la angiogénesis, que es la formación de nuevos vasos sanguíneos y que es un fenómeno importante en la carcinogénesis, a través de la estimulación de TLR 7 con imiquimod, se demostrado en ratones y en humanos que ligandos sintéticos de este receptor funcionan como agentes inhibidores de la angiogénesis.<sup>52,53-55</sup>

Sin embargo, para las células del mieloma múltiple se ha demostrado que loxoribina o R-848 que también son ligandos sintéticos de TLR7 inhiben potencialmente la apoptosis y promueven la proliferación y sobrevivencia de las células malignas.<sup>56,57</sup>

Nosotros en este trabajo, encontramos que la expresión de TLR7 a través de la técnica de inmunohistoquímica en células cancerosas del epitelio se encuentra disminuida en relación al tejido del epitelio laríngeo proveniente de muestras de pacientes sanos, por lo que las células cancerosas por si mismo podrían tener mecanismos intrínsecos, ya sea génicos o moleculares que afectarían la expresión de estos receptores de la inmunidad innata, disminuyendo así la efectividad de la acción de la respuesta inmune innata y adquirida, ya que existe una relación estrecha en el funcionamiento de estas dos ramas del sistema inmunitario. Al contar con ligandos de TLRs que pueden ser utilizados con agentes inmunoterapéuticos en el tratamiento del cáncer en laringe, el estudio de la expresión de este receptor (TLR7), ha demostrado su importancia, por lo que en un futuro se podría iniciar el tratamiento para este tipo de cáncer, ya sea como inmunoterapia directa o como potenciador de la respuesta inmune es decir adyuvante de la resección quirúrgica, la quimioterapia o la radioterapia.

## Conclusiones

1. Las células del epitelio laríngeo normal, expresan TLR7 de manera importante.
2. Las células cancerosas de laringe expresan menos TLR7.
3. Ligandos de este receptor representan un campo importante de investigación y desarrollo de estrategias inmunoterapéuticas del cáncer laríngeo.

## Referencias

1. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nature Rev Immunol* 2008; 8: 59-73.
2. Stagg J, Johnstone RW, Smyth MJ. From cancer immunosurveillance to cancer immunotherapy.
3. DGE. Registro Histopatológico de las Neoplasias en México, 2007
4. Huang B, Zhao J, Unkeless J, Feng ZH, Xiong H. TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword. Review. *Nature Oncogene* 2008; 27: 218-24.
5. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoevasion: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3: 991-98.
6. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoevasion. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 329-60.
7. Kiyoshi Takeda, Tsuneyasu Kaisho, Shizuo Akira RD. Toll-Like Receptors, Department of Host Defence, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Solution Oriented Research for Science and Technology, Japan Science and Technology Corporation, RIKEN Research Center For Allergy and Immunology, *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 335-76.
8. Miyake K. (2007) *Semin. Immunol.* 19, 3-10
9. Lee J, Chuang TH, Redecke V, She L, Pitha PM, Carson DA, Raz E.
10. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. *Science* 2004; 303: 1526-29.
11. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. *Science* 2004; 303: 1529-31.
12. Schon MP, Schon M, Klotz KN. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 1338-47.
13. Kariko K, Bhuyan P, Capodici J, Weissman D. *J Immunol* 2004; 172: 6545-49
14. Judge AD, Sood V, Shaw JR, Fang D, McClintock K, MacLachlan I. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 457-62.
15. Sioud M. *J Mol Biol* 2005; 348: 1079-90.
16. Marques JT, Williams BR. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 1399-405.
17. Lan T, Kandimalla ER, Yu D, Bhagat L, Li Y, Wang D, et al. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2007; 104: 13750-55.
18. Hassan F, Islam S, Tumorhuug, et al. Intracellular expression of Toll-Like Receptor 4 in neuroblastoma cells and their unresponsiveness to lipopolysaccharide. *BMC Cancer* 2006; 6: 281-9.
19. He W, Liu Q, Wuang L, et al. TLR 4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. *Mol Immunol* 2007; 44: 2850-9.
20. Huang B, Zhao J, Shen S, et al. *Listeria monocytogenes* promotes tumor growth via tumor cell Toll-Like Receptor 2 signaling. *Cancer Res* 2007; 67: 4346-52.
21. Fukata M, Abreu MT. Role of Toll Like receptors in Gastrointestinal Malignancies. *Oncogene* 2008; 7: 234-43.
22. Fukata M, Abreu MT. TLR 4 signaling in the intestine in health and disease. *Biochem soc trans* 2007; 35: 1473-8.
23. Jego G, Bataille R, Geffroy-Luseau A, et al. Pathogen associated molecular patterns are growth and survival factors of human myeloma cells through toll-like receptors. *Leukemia* 2006; 20: 1130-7.
24. Kelly Mg, Alvero AB, Chen, et al. TLR 4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 3859-68.
25. Kundu SD, Lee C, Billips Bk, et al. The Toll-Like Receptor pathway a novel mechanism of infection-induced carcinogenesis of prostate epithelial cells. *Prostate* 2008; 68: 223-9.
26. Ilvesaro JM, Merrell MA, Swaim TM, et al. Toll-Like Receptor 9 agonists stimulate prostate cancer invasion in vitro. *Prostate* 2007; 67: 774-81.
27. Jurk M, Vollmer J. Therapeutic applications of synthetic CpG Oligodeoxynucleotides as TLR 9, agonist for immune modulation *Bio Drugs* 2007; 21: 387-401.
28. Huang B, Zhao J, Li H, et al. Toll-Like Receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Res* 2005; 65: 5009-14.
29. Salaun B, Coste I, Risoan MC, et al. TRL can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *J immunol* 2006; 176: 4894-901.
30. Droemann D, Albrecht D, Gerdes J, et al. Human Lung cancer cells express functionally active Toll-Like Receptor 9. *Respir Res* 2005; 6: 1-10.
31. Szczepanski M, Stelmachowska M, Striczinski L, et al. Assessment of expression of Toll-Like receptors 2,3 and 4, in Laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2007; 264: 525-53.
32. Pivaresi A, Bodai L, Rethi B, et al. Expression and function of Toll-Like receptors 2 and 4, in human keratinocytes. *Int. Immunol* 2003; 15: 721-30.
33. Schon MP, Shon M. TLR-7 y TLR-8 como blancos para la terapia en el cáncer. *Oncogene* 2008; 27: 190-9.
34. Torres A, Storey L, Anders M, et al. Microanálisis de genes aberrantes en la expresión de la queratina actínica: efecto de las TLR-7 sobre el imiquimod. *Br J Dermatol* 2007; 157: 1132-47.

35. Stockfleth E, Meyer T, Benninghoff B, et al. Estudio aleatorizado doble ciego controlado de crema de imiquimod al 5% para el tratamiento de multiples queratosis actinicas. *Arch Dermatol* 2002; 138: 1498-502.
36. Lebolw M, Dinehart S, Whiting D, et al. Imiquimod 5% cream for the treatment of actinic keratosis: results from phase III, randomized, double blind, parallel group, vehicle-controlled trials. *J Am Acad Dermatol* 2004; 50: 714-21.
37. Szeimies RM, Gerritsen MJ, Gupta G, et al. Imiquimod 5% cream for the treatment of actinic keratosis: results from phase III, randomized, double blind, parallel group, vehicle-controlled trials. *J Am Acad Dermatol* 2004; 51: 547-55.
38. Korman N, Moy R, Ling M, et al. Dosing with 5% imiquimod cream 3 times per week for the treatment of actinic keratosis: results of two phase 3 randomized, double blind, parallel group vehicle controlled trials. *Arch Dermatol* 2005; 141: 467-73.
39. Krieg AM, Vollmer J. TLR-7,8 y 9, ligadas a la inmunidad innata y la autoinmunidad. *Immunol Rev* 2007; 220: 251-69.
40. Mashiah J, Brenner S. Mecanismos posibles en la inducción de penfigo foliaceo por el tratamiento topico con imiquimod. *Arch Dermatol* 2005; 141: 908-9.
41. Al-Dujaili Z, Hsu S. Imiquimod-induced vitiligo. *Dermatol Online J* 2007; 13: 10.
42. Gilliet M, Conrad C, Geiges M, et al, La psoriasis producida por los TLR-7 y la presencia de plasmositosis dermica en células precursoras dendríticas. *Arch Dermatol* 2004; 140: 1490-5.
43. Dummer R, Hauschild A, Becker JC, et al. An exploratory studies systemic administration of the Toll Like Receptor -7 agonist 852A in patients with refractory metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 856-64.
44. Spaner DE, Foley R, Galipeau J, et al. Obstáculos para la efectividad de los agonistas TLR en la terapia de malignidades hematológicas. *Oncogenes* 2008; 27: 208-17.
45. Spanes DE, Miller RI, Mena J, et al. Regresiones de depósitos linfomatosos de piel en pacientes con leucemia linfocítica crónica tratados con agonistas de los receptores TLR-7 y 8 e imiquimod. *Leuk linfoma* 2005; 46: 935-9.
46. Hesling C, D'Incan M, Mansard S, et al. In vivo and in situ modulation of the expression of genes involved in metastasis and angiogenesis in a patient treated with topical imiquimod for melanoma skin metastases. *Br J Dermatol* 2004; 150: 761-7.
47. Majewski S, Marczak M, Mlynarczyk B, et al. Imiquimod is a strong inhibitor of tumor cell-induced angiogenesis. *Int J Dermatol* 2005; 44: 14-19.
48. Li VW, Li WW, Talcott KE, et al. Imiquimod as an antiangiogenic agent. *J Drugs Dermatol* 2005; 4: 708-17.
49. Li VW, Li WW. Antiangiogenesis in the treatment of skin cancer. *J Drugs Dermatol* 2008; 7(Suppl. 1): s17-s24.
50. Bohnhorst J, Rasmussen T, Moen SH, et al. Toll-like receptors mediate proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Leukemia* 2006; 20: 1138-44.
51. Jego G, Bataille R, Geffroy-Luseau A, et al. Pathogen-associated molecular patterns are growth and survival factors for human myeloma cells through Toll-like receptors. *Leukemia* 2006; 20: 1130-7.

