

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS**  
**DIVISIÓN DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**



**“EL MODELO DEL PELIGRO: LA IMPORTANCIA DE LOS RECEPTORES  
TLRs EN LA INMUNIDAD INNATA”**

**MODALIDAD: INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO**

Opción: TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA

TEXCA TATEVARI MENDEZ LOPEZ

DIRECTORA

MARIA DEL ROSARIO HUIZAR LOPEZ

**LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JALISCO, ENERO DEL 2007**



**Universidad de Guadalajara**  
**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y**  
**Agropecuarias**

*Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura  
en Biología*

830 / C. C. BIOLOGÍA

**C. TEXCA TATEVARI MENDEZ LOPEZ**  
**PRESENTE**

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **Investigación y Estudios de posgrado opción Trabajo Monográfico de Actualización** con el título: **"El modelo del peligro: La importancia de los receptores TLR en la inmunidad innata"** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo el/la: **DRA. MARIA DEL ROSARIO HUIZAR LOPEZ** y el Asesor/a es el/la:

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Zapopan., 10 de Octubre del 2006.  
"2006. Año del Bicentenario del natalicio del Benemérito de las Américas.  
Don Benito Juárez García"

**DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA**  
**PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

**M en C. ISELA ÁLVAREZ BARAJAS**  
**SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

**BIBLIOTECA CUCBA**

Dr. Carlos Álvarez Moya.  
 Presidente del Comité de Titulación.  
 Carrera de Licenciado en Biología.  
 CUCBA.  
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad Investigación y estudios de posgrado\_\_\_, opción Trabajo monográfico de actualización\_\_\_ con el título: " \_El modelo del peligro: La importancia de los receptores TLRs en la inmunidad innata\_" que realizó el/la pasante Méndez López Texca Tatevari\_\_\_ con número de código B00002372 \_\_\_ consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente  
 Lugar y fecha.

Predio las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco  
 22/01/07

Firma   
 Nombre Maria del Rosario Huizar López  
 nombre  
 Director/a del trabajo,

firma  
 Asesor(es)

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dra. Zaitseva Galina Petrovna		30.01.07
Dr. Islas Rodríguez Alfonso Enrique Dr. Peregrina Sandoval Jorge		29 Enero 07
Supl. Dra. Medina Ceja Laura Guadalupe		30/01/07 25/01/07

*Handwritten notes:*  
 VoBo  
 CUCBA  
 31/01/07

**“Nada en biología tiene sentido excepto a la luz de la evolución”**

Theodosius Dobzhansky

**A mis padres Rosa y Rafael por la vida, su amor, sus deliciosas pláticas y herencia su conciencia y compromiso con la lucha social, a mis hermanos Tonantzin, Tupac y Xochiquetzal por su amor y su sentir a mi abuela Teresa por su fuerza y a mis abuelos Ángeles y Faustino.**

**A todos aquellos que les apasiona la ciencia, que han luchado por la ciencia y aquellos científicos comprometidos con la humanidad.**

**Agradezco con mucha sinceridad a la Dra. Rosario por su dedicación a la enseñanza, la guía que me dio y su amistad.**

**A Daniela y su familia por su amor y apoyo.**

**Al Dr. Alfonso Islas y a todo su equipo del laboratorio de PNA del CUCBA U. de G., a Jesús “Kecha” por su camaradería y a Poncho por ayudarme con las imágenes.**

## CONTENIDO

i-INDICE DE FIGURAS

ii- INDICE DE TABLAS

iii- ABREVIATURAS

v- RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	1
2. INMUNIDAD INNATA .....	2
Principios de la Inmunidad innata.....	4
Barreras externas en contra de la infección.....	5
Componentes celulares de la respuesta inmune innata.....	6
Mediadores de la inflamación.....	11
3. INMUNIDAD ADAPTATIVA.....	11
Principios de la respuesta inmune adaptativa.....	11
Fases de la respuesta inmune adaptativa.....	13
Celular.....	15
Humoral.....	16
Interface entre al inmunidad innata y la adquirida.....	17
4. PAMPs (Patrones moleculares asociados a patógenos) .....	18
5. CARACTERÍSTICAS DE LOS RECEPTORES TOLL EN <i>Drosophilla</i> .....	19
6. CARACTERÍSTICAS DE LOS RECEPTORES TLRs DE MAMÍFEROS.....	22
Regulación en la expresión de los TLRs.....	26
7. TLRs DEL 1-11.....	26
TLR1, 2,6.....	27
TLR3.....	28
TLR4.....	28
TLR5.....	30
TLR7, 8.....	30

TLR9.....	31
TLR11.....	42
8. EL MODELO DEL PELIGRO.....	32
9. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN QUE SE ACTIVAN CON LOS RECEPTORES TOLL Y LOS TLRs.....	36
Ruta de señalización dependiente de MyD88.....	38
Ruta de señalización independiente de MyD88.....	39
Regulación de la señalización de los TLRs.....	40
Regulación en la transcripción que involucra a los receptores TLRs.....	41
10. SÍNTESIS DE PNA.....	42
11. PATOLOGÍAS QUE INVOLUCRAN A LOS TLRs.....	46
Sepsis.....	48
Inmunodeficiencias.....	49
Arteroesclerosis.....	50
Autoinmunidad.....	62
12. PERSPECTIVAS Y DISCUSIÓN.....	51
13. CONCLUSIONES.....	53
14.-BIBLIOGRAFÍA.....	54

## INDICE DE TABLAS

Tabla I. $\alpha$ -Defensinas de mamíferos.....	57
---	----

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución del sistema inmunológico.....	3
Figura 2. Interacción entre la RII y la RIA.....	18
Figura 3. Receptores Toll de <i>Drosophila</i> .....	20
Figura 4. El receptor Toll al ser estimulado.....	22
Figura 5. Morfología de la proteína Toll y TLR , se muestran las partes que la conforman y se indica la función que realizan.....	24
Figura 6. Esquema se muestra los PAMPs que activan a un respectivo TLR.....	25
Figura 7. Los PAMPs y su función en el modelo del peligro.....	30
Figura 8. Historia de los modelos inmunológicos, incluyendo el modelo del peligro.....	35
Figura 9. Ruta de señalización de los TLRs.....	36
Figura 10. Estructura tridimensional del péptido antimicrobiano defensina a) $\alpha$ - Defensina b) $\beta$ -defensina.....	40
Figura 11. Expresión de diferentes PNAS tejido-especifico en <i>Drosophilla</i> y Humano.....	44

## ABREVIATURAS

AP-1- Proteína activadora-1

CD14- Grupo de diferenciación 14

APC- Célula presentadora de antígeno

CTL- Dominio de lectina tipo C

**DAMPs**- Patrones moleculares asociados a peligro

**Dif**- Factor dorsal relacionado con inmunidad

**DNA- CpG**- Dinucleótidos no metilados de citosina y guanina

**dsRNA**- RNA de doble hebra

**EDA** - Dominio A de fibronectina.

**ELAM**- Molécula de adhesión a leucocito endotelial.

**TNF**- factor de necrosis tumoral.

**HBD 1,2** – Defensina human 1, 2

**HSP**- Proteína de shock térmico

**Ig**- Inmunoglobulina

**IIR**- Receptor inmunologico innato

**IKK**- Inhibidor de  $\kappa B$

**IL**- Interleucina

**INF- $\alpha$** - Interferon- $\alpha$

**INF- $\beta$**  -Interferon- $\beta$

**INS**- Infeccioso no propio “infection-non self”

**IRAK**- Receptor de interleucina parecido a kinasa

**IRF3**- Factor 3 regulador de interferón

**LBP**- Proteína de unión a LPS

**LPS**- Lipopolisacárido

**LRR**- Regiones ricas en leucina

**Mal**- Adaptador parecido a MyD88

**MBL** -Manosa de unión a Lectina

**MHC**- Molécula del complejo mayor de histo compatibilidad

**MyD88**- Factor 88 de Diferenciación Mieloide

**NF- $\kappa B$** - Factor nuclear de transcripción  $\kappa B$

**NK**- Célula asesinas natural

**NOD**- Dominio de oligomerización de nucleótidos

**PAMPs**- Patrones moleculares asociados a patógenos

**PDC**- Células dendríticas plasmocíticas

**PGN**- Péptidoglicanos

**PMN**- Polimorfonuclear

**PRR**- Receptor de patrones de reconocimiento

**RI**- Respuesta inmune

**RII**- Respuesta inmune innata

**RIC**-Respuesta inmune celular

**RIA**- respuesta inmune adaptativa

**SAA**- Proteína de fase acuosa

**SNS**- Propio-no propio "self- non self"

**SRs**- Receptor de fagocitosis

**sRNA**- Ácido Ribonucleico de cadena sencilla

**ssRNA**- Ácido Ribonucleico de doble hebra

**TAK1**-Factor de crecimiento activador de kinasa I en mamíferos

**TCR**- Receptor de célula T

**TH1**-Célula T cooperadora 1

**TIR**- Receptor Toll/IL-1

**TIRAP**- Molécula adaptadora conteniendo el dominio TIR

**TLR**- Receptor parecido a Toll

**TRAF-6**- Factor de necrosis tumoral asociado al factor-6

**TSS**- Sistema de secreción Tipo III

## RESUMEN

Los microorganismos representan una constante amenaza para todos los seres vivos. Consecuentemente, fue indispensable para la evolución de los animales, el desarrollo de mecanismos poderosos para contener a los microorganismos invasores. El sistema inmune innato (SII), fue el primero en desarrollarse y se caracteriza por discriminar a un microorganismo de otro. su función es muy similar frente a la mayoría de los agentes infecciosos además de que se encuentra en toda la escala evolutiva (1).

Todos los organismos multicelulares han desarrollado una habilidad para reconocer microorganismos invasores y eliminarlos efectivamente sin causarse daño en sus tejidos, ayudado por moléculas que se pueden sintetizar de manera continua (constitutiva) y aquellas que se pueden expresar de una manera selectiva e inducible, que tienen como función detectar a los antígenos que pudieran haber cruzado las primeras barreras del SII o las señales de peligro producidas por las células del mismo sistema (2).

La defensa del hospedero en contra de patógenos microbianos invasores se observa en el funcionamiento del Sistema Inmune. La inmunidad en los vertebrados puede tener dos categorías, la Respuesta inmune Innata (RII) y la Respuesta Inmune Adaptativa (RIA). El sistema inmune de los mamíferos utiliza dos estrategias de reconocimiento: una a los "microbios no-propios" PAMPs y otra a la "pérdida de lo propio" DAMPs.

En caso de reconocimiento de un microbio que cause una infección se presentan moléculas activadoras de la respuesta inmune. Las moléculas reconocidas son los Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) que son productos moleculares altamente conservados derivados del metabolismo de los microorganismos patógenos

(4) y células dañadas por infección o daño por otros medios que no sean los de apoptosis patrones moleculares asociados a peligro DAMPs.

Cuando se encuentran estas moléculas con el sistema inmunológico, las primeras moléculas en reconocerlos son los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), estos se expresan en células epiteliales y células efectoras de la inmunidad innata. Los PRRs pueden ser de tres tipos: Endocíticos, Secretados, de Señalización.

Un ejemplo de los PRRs es el receptor Toll, una proteína transmembranal tipo I descrita en la mosca *Drosophila melanogaster* perteneciente a la clase de los receptores de señalización (5). Estos receptores juegan un papel esencial en el desarrollo embrionario. (5, 7, 3, 8) posteriormente se demostró en la respuesta de insectos a infecciones causadas por hongos (9).

Subsecuentemente los receptores parecidos a Toll (TLRs) fueron descubrieron en mamíferos por búsqueda de homólogos en bases de datos de secuencias completas de organismos (Medzhitov 1997) incluyendo las células humanas. (10).

Los receptores TLRs han permitido un nuevo modelo de interpretación del sistema inmune, como es el caso del modelo del peligro, el cual propone que las células presentadoras de antígeno (APC) son activadas por Patrones Moleculares Asociados a Peligro (DAMPs), producidos por la interacción con patógenos, toxinas, daño mecánico entre otras. Además estas señales se pueden presentar con carácter inducible o constitutivo y de origen intracelulares o secretadas, recayendo su importancia en que estas señales de alarma no pueden ser mandadas por células sanas o por muerte fisiológica normal y en el cual un microorganismo foráneo no es la característica importante para responder en contra de lo no propio y lo muy propio no es garantía de tolerancia (12).

El estudio de la inmunidad innata es un campo que representa un paradigma renacido gracias al descubrimiento de nuevas moléculas y mecanismos que han permitido el entendimiento de procesos evolutivos y de algunos de los problemas de salud pública actuales. Por lo que el objetivo de este trabajo es realizar un texto de vanguardia, original en el que se describirán las características más actualizadas de los receptores TLRs y su función dentro de la respuesta inmune innata, así como el modelo del peligro, y su importancia en la prevención y desarrollo de enfermedades.

## 1.-INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

Nuestro cuerpo esta constantemente expuesto a microorganismos, presentes en nuestro ambiente, incluyendo patógenos que son compartidos por otros individuos infectados, el contacto con estos patógenos se da en las superficies, epitelio externo e interno, como es el caso de patógenos asociados que afectan el tracto respiratorio y, los patógenos asociados a los alimentos, que entran por el tracto gastrointestinal.

Inicialmente este proceso de invasión es contenido por los mecanismos de la respuesta inmune que preexisten en todos los organismos y comienzan a actuar en minutos para contener a los agentes infecciosos. Este proceso altamente dinámico y los microorganismos oportunistas han encontrado en ellos su nicho ecológico, dando origen a una relación hospedero-huésped (13), esta relación es además, multidimensional.

Las primeras células capaces de realizar esta función, propia de los organismos multicelulares presentan tambien un sistema de defensa capaz de reconocer y responder contra aquellas moléculas propias (14) y además peligrosas (12), producidas por tejidos dañados o infectados por virus, bacterias y hongos.

Este sistema, conocido como el sistema inmunológico se divide en la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adquirida, la RII se encuentra desde el nacimiento y se presenta sin estimulación previa. La caracterización funcional de los receptores TLRs ha establecido que la inmunidad innata es un sistema experto que detecta patógenos microbianos invasores (8).

Los TLRs juegan un papel importante en el reconocimiento de componentes de patógenos en la activación del sistema inmune innato y el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa (15, 16).

Los lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicanos y ácidos lipoteicoicos (LTAs) son moléculas que se encuentran en la superficie de las bacterias, pero no en las células eucarióticas por lo que su reconocimiento específico por el sistema inmune innato indica la presencia de una infección (4, 17). Más adelante hablaremos de cuales serían las moléculas del peligro.

## 2.-INMUNIDAD INNATA

Los microorganismos que causan patologías en los humanos y animales, pueden entrar en los cuerpos de estos, por diferentes sitios y provocar una enfermedad de muchas maneras. Los microorganismos infecciosos que se comportan de esta manera son nombrados microorganismos patógenos o simplemente, patógenos. La RII es un mecanismo inmunológico que se encuentra desde el nacimiento en los seres vivos y se presenta aun cuando los patógenos son reconocidos por primera vez sin una exposición previa y sin cambiar de intensidad a las exposiciones posteriores, además desempeña funciones importantes en la inducción de la respuesta inmune adquirida.

La RII presentan elementos esenciales como:

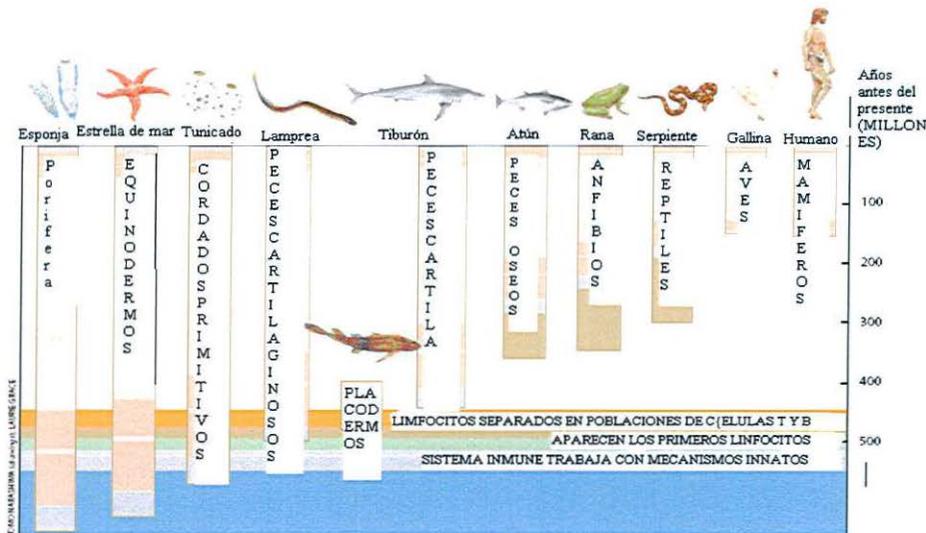
1) Barreras físicas y químicas: epitelios y sustancias antimicrobianas como péptidos naturales antimicrobianos (PNA) producidas en la superficie epitelial.

2) Proteínas sanguíneas: entre las que se incluyen miembros del sistema del complemento y mediadores de la inflamación.

3) Células fagocíticas y otros leucocitos: como las células asesinas naturales (NK).

Lo anterior representa la primera línea de defensa para responder a la invasión de microorganismos en el cuerpo, por lo que la patogenicidad de estos últimos se relaciona en parte a la capacidad de resistir a los mecanismos de la inmunidad innata (18).

Recientemente el estudio de la RII ha ganado interés, particularmente porque se acepta su antiguo origen evolutivo y queda claro que puede ser resolutive al inicio de una infección, encontrándose incluso en organismos multicelulares simples (invertebrados), mientras que la inmunidad adquirida sólo se encuentra en vertebrados, en la escala evolutiva apareció hace 500 millones de años (3).



Becker G. 1996. *Scientific american*.

Fig.1. Evolución del sistema inmunológico.

La inmunidad innata tiene la capacidad de discriminar un microorganismo de otro, aunque su función poco específica, no genera memoria inmunológica, frente a la mayoría de los agentes infecciosos (18).

## **PRINCIPIOS DE LA INMUNIDAD INNATA**

La RII proporciona al hospedero una importante y rápida primera línea de defensa que impide la invasión de los patógenos y/o su diseminación en el organismo.

Tradicionalmente se ha considerado que produce una rápida e incompleta defensa antimicrobiana en el huésped hasta que se genera la Respuesta Inmune Adquirida (RIA), que es realizada por los linfocitos T y B y que se fundamenta en la producción de citocinas y anticuerpos, es más lenta pero definitiva. También tiene un papel adicional para determinar a qué antígenos responde la RIA y la naturaleza de esa respuesta, distinguiendo diferentes tipos de bacterias patógenas, virus y hongos siendo la inmunidad innata la que enseña a estas células antígeno-específicas a reconocer que elementos necesita una respuesta inmune.

Los distintos componentes de la RII además de sus funciones de defensa e inmunoregulación de las respuestas adaptativas, juega un papel importante en el desarrollo de los procesos autoinmunes (24, 25).

Las células del SII están localizadas en los bordes endoteliales y epiteliales de los tejidos y reconocen antígenos no procesados, carbohidratos o ácidos nucleicos expresados por los patógenos utilizando diferentes receptores (7).

La RII utiliza poblaciones de células: asesinas naturales, células dendríticas, macrófagos y polimorfonucleares así como componentes solubles: péptidos antimicrobianos, sistema del complemento, factor de necrosis tumoral (FNT), interleucina 1 (IL-1), interleucina 12 (IL-12) e interleucina 18 (IL-18) para la eliminación de elementos extraños o propios que ponen en peligro la supervivencia del hospedero.

### **BARRERAS EXTERNAS CONTRA INFECCIONES:**

La forma más sencilla que tiene un organismo de evitar alguna infección es el evadir el ingreso del microorganismo al cuerpo. La primera línea de defensa es la piel, la cual es impermeable a la mayoría de los agentes infecciosos. Numerosas bacterias no pueden sobrevivir mucho tiempo en la piel debido a los efectos inhibitorios de ciertas sustancias como son el ácido láctico, los ácidos fáticos, además del pH bajo que existe en este tipo de secreciones (26)

El moco secretado por las membranas que se encuentran en las superficies internas del cuerpo actúan como una barrera de protección, para bloquear la adherencia de las bacterias hacia las células epiteliales. Una vez que han sido atrapadas por el moco, las bacterias son eliminadas mediante movimientos mecánicos como son el movimiento ciliar, el toser o estornudar. Muchos de los fluidos corporales que se secretan contienen componentes bactericidas como el ácido en los jugos gástricos, la espermina y el zinc en el semen, la lactoperoxidasa en leche, las lisozimas en lagrimas, secreciones nasales, saliva y como una línea de defensa importante se ha comenzado a estudiar extensivamente durante la última década, los PNAs que se encuentran en muchas de las secreciones ya mencionadas anteriormente (18,20,27).

## COMPONENTES CELULARES DEL SISTEMA INMUNE INNATO

Los fagocitos son células que juegan un papel predominante en la fagocitosis. estas células son los neutrófilos, monocitos/macrófagos y en menor grado los eosinófilos. Después de la expresión de moléculas de adhesión, los neutrófilos y monocitos sanguíneos son reclutados al sitio de infección siendo los neutrófilos en un comienzo los primeros en entrar a las áreas inflamadas.

Los polimorfonucleares (PMN) son células pertenecientes al SII. contienen gránulos citoplasmáticos con un núcleo lobulado característico, existen tres tipos de PMN: Neutrófilos, Basófilos y Eosinófilos (18,27).

**NEUTRÓFILO:** También llamados leucocitos polimorfonucleares por su núcleo multilobulado y de variada morfología, son las poblaciones más numerosas. Responden rápidamente a estímulos quimiotácticos; fagocitan y destruyen partículas extrañas; pueden ser activados por citocinas producidas sobre todo por macrófagos y células endoteliales y son la población celular principal en la respuesta inflamatoria aguda. También poseen receptores para un tipo de anticuerpo llamado inmunoglobulina G, (IgG) y para proteínas del complemento, migran y se acumulan en lugares donde se activa el complemento. Por lo tanto, fagocitan partículas opsonizadas y actúan como células efectoras de la inmunidad humoral (20,28).

**BASÓFILO:** Son células circulantes con una función muy similar a la de los mastocitos tisulares. Tanto basófilos como mastocitos expresan receptores de alta afinidad por la IgE y por tanto, se le une fácilmente a moléculas de IgE libres estimulando a basófilos y mastocitos a secretar las sustancias contenidas en sus gránulos, que son los

mediadores químicos de la hipersensibilidad inmediata. De este modo, estos granulocitos son células efectoras de la hipersensibilidad inmediata medida por IgE.

**EOSINÓFILO:** Estas células actúan principalmente en la defensa en contra de determinados agentes infecciosos, expresan receptores para una clase de anticuerpos IgE son capaces de fijar con facilidad partículas recubiertas con esta molécula y se especializan en eliminar agentes que estimulan la producción de IgE como son los helmintos, estos aunque pueden resistir las enzimas lisosomales de neutrófilos y macrófagos, no así a las proteínas especializadas de los gránulos. Son muy abundantes en los lugares en los que se produce reacciones de hipersensibilidad inmediata, contribuyendo al daño tisular y la inflamación. Su crecimiento y diferenciación es estimulada por una citocina producida por los linfocitos T colaboradores llamada interleucina-5 (IL-5) y la activación de los linfocitos T contribuye a la acumulación de los eosinófilos en los lugares con infección parasitaria y reacciones alérgicas (18,28).

**MACRÓFAGO:** El sistema de fagocitos mononucleares representa la segunda población celular en importancia del sistema inmunitario y consta de células que tienen una estirpe común, cuya función principal es la fagocitosis. Todas las células del sistema fagocítico mononuclear se originan en la médula ósea, tras su maduración y posterior activación, pueden adquirir diferentes tipos morfológicos. El primer tipo de células que entra en la sangre periférica después de dejar la médula ósea no está completamente diferenciado y se les denomina monocitos. Los monocitos tienen un diámetro de 10 a 15  $\mu\text{m}$ , poseen un núcleo en forma de frijol y un citoplasma finamente granular que contiene lisosomas, vacuolas fagocíticas y filamentos citoesquelético. Una vez que colonizan los tejidos, estas células maduran y se convierten en macrófagos, también llamados

(histocitos). Los macrófagos pueden activarse por una gran variedad de estímulos y pueden adquirir formas diferentes. Algunos llegan a tener un citoplasma abundante y se llaman células epitelioides por que se parecen a las células epiteliales de la piel. Los macrófagos son capaces de fusionarse para formar células gigantes multinucleadas. Los macrófagos se encuentran en todos los órganos, tejidos conectivos y reciben nombres esenciales para designar localizaciones específicas (20.27).

Los fagocitos mononucleares desempeñan las siguientes funciones en las fases de reconocimiento, activación y efectora de la inmunidad específica.

1.-Los macrófagos muestran en su superficie antígenos extraños de forma que pueden ser reconocidos por células T antígeno-específicos, además producen proteínas solubles citocinas que estimulan la proliferación y diferenciación de los linfocitos, considerando a los macrófagos como células accesorias en la activación de los linfocitos.

2.-Los macrófagos se encuentran entre las principales células efectoras de la inmunidad mediada por células.

3.-Los macrófagos participan en la eliminación de antígenos extraños mediante la respuesta inmunitaria humoral.

Están presentes en el tejido conectivo, alrededor de la membrana basal de las venas de pequeño calibre y particularmente concentrados en pulmones, hígado, bazo y nódulos linfáticos.

**CÉLULAS DENDRÍTICAS:** Las células dendríticas son células accesorias que juegan un papel importante en la inducción de la respuesta inmunitaria. Estas células se identifican morfológicamente por tener proyecciones membranosas o espinosas. Existen dos tipos de

células dendríticas con propiedades y funciones diferentes. Las Células dendríticas interdigitales, generalmente llamadas células dendríticas. Están presentes en el intersticio de la mayoría de los órganos, son muy ricos en las zonas abundantes de células T de los ganglios linfáticos y el bazo, se encuentran dispersos por toda la epidermis de la piel, en donde reciben el nombre de células de Langerhans, estas células contienen un organelo citoplasmático especial llamada gránulo de Birbeck, pero no se conoce su función.

Las células de Langerhan son capaces de captar antígeno que entran a través de la piel y transportarlos hacia los ganglios linfáticos de drenaje, en donde se pone en marcha la respuesta inmunitaria.

El segundo tipo de células dendríticas se llaman células dendríticas foliculares por que están presentes en los centros germinales de los folículos linfoides de los ganglios linfáticos, bazo y tejidos linfoides asociados a mucosas. La mayoría de las células dendríticas foliculares no derivan de precursores de la médula ósea y no están relacionadas con las células dendríticas interdigitales. Estas células atrapan antígenos unidos a anticuerpos o productos del complemento y los expresa en su superficie para que sean reconocidos por los linfocitos B.

**MASTOCITOS:** Son células grandes de forma redonda 20-30  $\mu\text{m}$  se caracterizan por presentar el citoplasma lleno de gránulos basófilos. Su núcleo es esférico y está situado en el centro de la célula.

Estas células se ubican cerca de los vasos sanguíneos, los gránulos que presentan contienen heparina y proteoglicano sulfatado de alrededor de 750 kD que forma la matriz de los gránulos. A esta macromolécula se asocian varias moléculas de bajo peso cargadas positivamente como la histamina; proteasas neutras y factores quimiotácticos para

cosinófilos y neutrófilos. Su superficie muestra largas prolongaciones muy finas, su citoplasma contiene pocos organelos y sus gránulos pueden presentar un grado variable de compactación.

**CÉLULAS NK:** Las células NK o asesinas naturales, se desarrollan en la médula ósea a partir de una célula progenitora común de origen linfoide y circulan por la sangre, son más largas que los linfocitos B y T, tienen gránulos citoplasmáticos distintivos, se identifican por su habilidad de matar *in vitro* a ciertas líneas celulares linfoides que son tumorales, todo esto previo a la inmunización o la activación. Las células NK son activadas como respuesta a interferones o citocinas producidas por macrófagos, en la fase temprana de la infección protegen al huésped de una gran variedad de patógenos intracelulares. Las células NK tienen un mecanismo de reconocimiento para distinguir entre células infectadas y no infectadas, se cree que un mecanismo probable es que reconoce alteraciones en la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, otro mecanismo pudiera ser los cambios en las glucoproteínas de la superficie celular inducidas por bacterias o virus en la infección, sin embargo aún no está claro su sistema de reconocimiento entre lo propio y lo no propio (18, 20,28).

**SISTEMA DEL COMPLEMENTO:** El sistema del complemento comprende un grupo de más de 30 proteínas séricas y de la superficie celular, que interactúan con otras moléculas del sistema inmunitario y entre ellas mismas de una manera intensamente controladas, con el fin de suministrar muchas de las funciones efectoras de la inmunidad humoral y la inflamación. (18). El Sistema del Complemento se considera como un componente fundamental del SII, es uno de los principales mecanismos efectores de la inmunidad dependiente de anticuerpos, tiene varias funciones importantes.

Son conocidas tres rutas del complemento. La ruta clásica, la alternativa y la de Manosa de unión a Lectina por sus siglas en inglés (MBL). La ruta alternativa y la MBL son un subsistema de la inmunidad innata, el cual provee la primera línea de defensa.

## **MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN EN LA INMUNIDAD INNATA**

La citocinas secretadas por los fagocitos en respuesta a infecciones incluye IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, y TNF-[alpha]. La IL-1 activa el endotelio vascular y linfocitos además incrementan la adherencia de los leucocitos. La IL-8 induce la expresión de molécula de adhesión [beta]2 integrina sobre los neutrófilos, permitiendo a estos últimos migrar al sitio de infección. TNF-[alpha] activa el endotelio vascular e incrementa la permeabilidad vascular, permitiendo la acumulación de Ig y complemento en tejidos infectados. La IL-6 induce la diferenciación terminal de células-B en células plasmáticas productoras de Ig. La IL-12 activa células NK e induce la diferenciación de células Th1. IL-1, IL-6, y TNF-[alpha] juegan un papel en la inducción de la fase aguda en el hígado e incluso induciendo fiebre. El IFN-[alpha] y IFN-[beta], los cuales son producidos por células infectadas por virus, inhiben la replicación viral y activan las células NK. Estos regulan fuertemente la expresión de las moléculas MHC de clase I en células infectadas por virus, incrementando la eficacia en la presentación de péptidos virales e incrementando su susceptibilidad para ser eliminados por las células T citotóxicas (18).

### **3.-PRINCIPIO DE LA RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA**

La RIA se desarrolla cuando los agentes infecciosos no son eliminados por los mecanismos innatos de defensa y se induce debido a la presencia excesiva de antígenos y es efectiva después de varios días; tiempo requerido para que los linfocitos T y B reconozcan a dichos antígenos, se diferencien y conviertan en células efectoras.

La RIA presenta varias características distintivas como son:

En colaboración con la RII, la RIA representa una resistencia mucho más evolucionada. es estimulada después de la exposición a agentes infecciosos, cuya intensidad y capacidad defensiva aumenta después del último encuentro con un microorganismo en particular. Para ello la RIA consta de linfocitos B, T y NK además de sus productos, entre ellos los anticuerpos, con las siguientes características:

1) Una especificidad en contra de moléculas diferentes.

2) La especialización, que les permite responder de forma singular a distintos tipos de microorganismos.

3) Su capacidad para recordar y responder con más fuerza, a los encuentros siguientes con el mismo microorganismo.

4) Su multifactorialidad, la Respuesta Inmune depende de múltiples factores, tanto del agente biológico que la origina como del hospedero que responde, el tipo, virulencia, cantidad o dosis del agente agresor y su vía de penetración pueden generar varios tipos de respuestas; pero también la edad y la conformación genética del hospedero pueden ser elementos determinantes.

5) Su Autolimitación, todas las respuestas inmunitarias normalmente disminuyen con el tiempo después de la estimulación con el antígeno.

6) Discriminación entre lo propio y lo no propio, la falta de respuesta inmunológica también se llama tolerancia. La tolerancia frente a los antígenos propios (autotolerancia) es mantenida en parte mediante la eliminación de linfocitos que expresan receptores

específicos para estos antígenos propios y en parte por inactivación de la función de los linfocitos que han sido estimulados después de contactar con antígenos propios (21).

### **CÉLULAS INVOLUCRADAS EN LA RESPUESTA INMUNE ADQUIRIDA.**

Existen tres grandes tipos celulares involucrados en la inmunidad adquirida y se requieren una serie de interacciones entre ellos para que se de la respuestas inmune.

Dos de estos tipos celulares provienen de una célula precursora linfoide que se diferencia en distintas líneas de desarrollo.

Una línea se desarrolla en el timo y se conoce como linfocito T; La otra se desarrolla en el bazo y se conoce como linfocito B las dos se originan en la médula ósea. Las células linfocíticas T y B difieren en muchos aspectos funcionales pero comparten una propiedad importante de la RIA, presentan una especificidad hacia un antígeno. Por lo tanto las funciones de reconocimiento así como las reacciones más importantes de la RIA las realizan los linfocitos (21).

Las APCs tales como los macrófagos y las células dendríticas constituyen el tercer tipo celular que participan en la RIA, aunque estas células carecen de receptores antígeno-específicos como los linfocitos, su función es el procesar y presentar el antígeno a los receptores específicos (receptores de células T [TCR] en los linfocitos T).

Todos estos componentes en un conjunto forman los dos tipos de RIA que se conocen la celular y la humoral, interactúan en un sentido de retroalimentación y a continuación hablaremos de ellas.

### **FASES DE LA RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA**

La RIA redivide en dos tipos: respuesta inmune humoral (RIH) donde los antígenos producidos por las células B juegan un papel sobresaliente y la respuesta inmune celular (RIC) donde los linfocitos T son las células fundamentales.

Ambas respuestas comienzan con la activación de los linfocitos en los órganos linfoides secundarios por las células presentadoras de antígenos (APC), que llegan a estos órganos a través de la circulación linfática y desencadenan las siguientes fases:

**1) Fase de reconocimiento:** La fase de reconocimiento de la respuesta inmunitaria consiste en la unión de antígenos extraños a receptores específicos de los linfocitos maduros, que están presentes antes de la exposición al antígeno.

**2) Fase de activación:** Es la secuencia de acontecimientos inducidos en los linfocitos como consecuencia del reconocimiento de un antígeno específico. Todos los linfocitos sufren dos cambios principales como respuesta a los antígenos.

1) *prolifera*n, lo que provoca la expansión de clones específicos de linfocitos y la amplificación de la respuesta protectora.

2) La progenie de los linfocitos estimulados por el antígeno se *diferencia*n en células efectoras que eliminan el antígeno, o bien en células de memoria que recirculan preparadas para responder a una nueva exposición al antígeno (algunos linfocitos de la progenie estimulada por el antígeno mueren y se pierden a través del repertorio de respuesta). Una característica general de la activación de linfocitos es que habitualmente requiere dos tipos de señales: la primera la proporciona el antígeno y la segunda otras células que pueden ser células colaboradoras o células accesorias. La inmunización y reconocimiento del antígeno dispara numerosos mecanismos de amplificación que

aumentan rápidamente el número de células que responden frente al antígeno. Los linfocitos se dirigen eficientemente hacia los lugares de entrada de los antígenos y allí permanecen.

**3) Fase efectora:** Es el estadio en el que los linfocitos que han sido activados por los antígenos desarrollan las funciones que conducen a la eliminación de éstos. Los linfocitos que actúan en la fase efectora de la respuesta inmunitaria reciben el nombre de células efectoras. La respuesta inmunitaria específica sirve para amplificar y localizan en los antígenos extraños varios mecanismos efectores que son también funcionales en ausencia de activación linfocitaria (19).

#### **RESPUESTA INMUNE CELULAR:**

El reconocimiento antígeno -específico de la Respuesta Inmune Celular (RIC) está dado por los linfocitos T, cada uno tiene en su superficie receptores antigénicos idénticos y estos linfocitos se dirigen al sitio donde se encuentra el antígeno y desarrollan su función cuando interactúan con el mismo. Hay varias subpoblaciones de células T de las cuales cada una puede presentar la misma especificidad para un antígeno determinado, aunque cada subpoblación puede presentar funciones diferentes.

1.-Cooperación con células B para la producción de anticuerpos: Tales células son denominadas células T cooperadoras y funcionan al secretar citocinas que proveen varias señales de activación para las células B.

2.-Efectos inflamatorios: Durante la activación, una subpoblación de células T secretan citocinas que inducen la migración y activación de monocitos y macrófagos, originando las llamadas reacciones de hipersensibilidad retardada.

3.- Efectos citotóxicos: Las células T en este subgrupo se transforman en células asesinas que al contacto con la célula blanco sintetizan y secretan proteínas con acción citotóxica capaces de producir la muerte de las mismas. Estas células son denominadas células T citotóxicas.

4.- Efectos reguladores: Las células T cooperadoras de acuerdo a la producción de citocinas que secretan pueden dividirse en diferentes subgrupos. (TH1) (T cooperadores 1) secreta IL-2 (interleucina 2),  $INF\gamma$  (interferón gamma) y  $TNF\beta$  (factor de necrosis tumoral beta) y el TH2 (T cooperadores 2) que secreta IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. Los TH1 ejercen sus acciones sobre los macrófagos y la respuesta inmune celular, en tanto que los TH2 fundamentalmente activan los linfocitos B y como consecuencia la respuesta inmune humoral (27).

### **RESPUESTA INMUNE HUMORAL:**

La inmunidad humoral se efectúa mediante anticuerpos en el suero que son las proteínas producidas por las células B. Las células B inicialmente son activadas cuando se unen los antígenos a moléculas específicas de membrana que se convertirán en las inmunoglobulinas (Ig) (receptores de células B), que son expresadas por estas células. Una vez identificado el Ig las células B reciben la señal para transformarse en células plasmáticas y comenzar a secretar la Ig específica, un proceso que inicia la respuesta total de anticuerpos cuyo propósito es eliminar al antígeno del hospedero.

Los anticuerpos son una mezcla heterogénea de globulinas séricas las cuales comparten la habilidad de unirse individualmente a antígenos específicos. Todas las globulinas séricas con actividad hacia los antígenos se conocen como inmunoglobulinas.

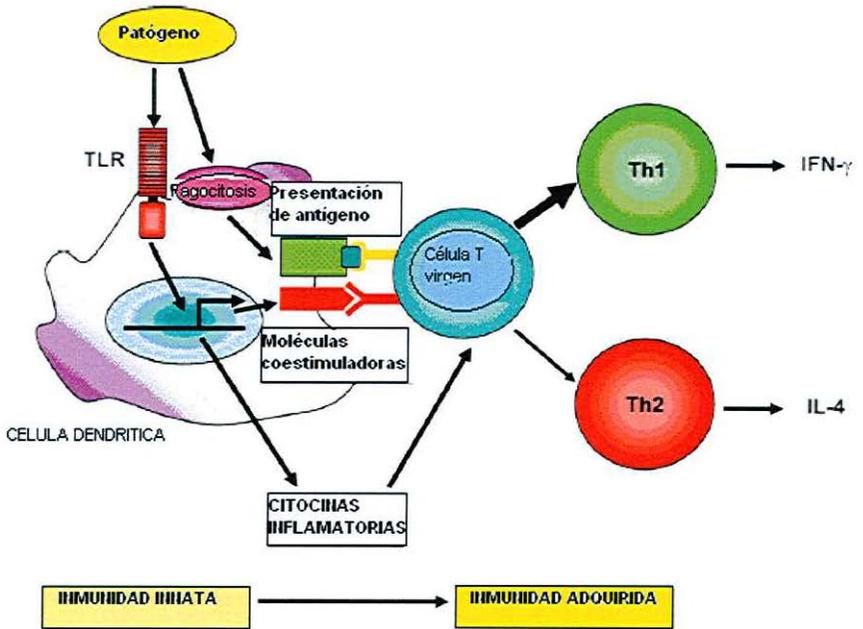
Las moléculas de inmunoglobulinas tienen estructuras en común que las capacita para realizar dos funciones: 1) reconocer y unirse específicamente a una entidad estructural única en un antígeno llamado epítotope y 2) desarrollar una función común biológica después de haberse combinado con el antígeno. Básicamente cada molécula de inmunoglobulina consiste de dos cadenas ligeras idénticas entre sí y dos cadenas pesadas también idénticas entre sí unidas por un puente disulfuro (19,21,28).

## **LA INTERFACE ENTRE LA INMUNIDAD INNATA Y LA ADQUIRIDA**

Una de las acciones fundamentales que realiza la RII es la de estimular el desarrollo de la RIA esta interfase y los consecuentes sucesos o fallos son esenciales en remover patógenos en el reconocimiento temprano de microbios por componentes del sistema inmune innato e involucran a:

- a) El sistema del complemento
- b) Los receptores especializados expresados sobre células NK.
- c) La familia de los receptores TLRs, que son expresados sobre células mieloides y linfoides y que reconocen estructuras específicas derivadas de microbios.

Sucesivamente algunas rutas metabólicas permiten a una respuesta inflamatoria la destrucción de los patógenos junto con la interacción de células dendríticas y células B y/o T. Una bien orquestada respuesta inmune innata y adaptativa permitirá la erradicación del patógeno y la inmunidad del hospedero. Fallas para eficientemente discriminar lo propio de lo no propio en la inmunidad innata y adquirida puede permitir la proliferación de patógenos y poder llegar a una sepsis y puede ser la causa para el desarrollo y mantenimiento de enfermedades auto inmunes y alergias (8) (ver Figura 2).



Takeda et al. 2005 *International Immunology*.

Fig.2. Interfase entre la RII y RIA y la función de los receptores TLRs.

#### 4.-PATRONES MOLECULARES ASOCIADOS A PATOGENOS (PAMP's)

Los Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) se definen como productos moleculares altamente conservados de los microorganismos (4) patógenos y no patógenos que forman parte esencial en la supervivencia de estos.

Los PAMPs han mostrado ser importantes activadores de la RII y RIA y están involucrados en desordenes sistémicos. Como son el (LPS) lipopolisacárido por (producto de bacterias gram-negativas), peptidoglicanos PGN y zimosan (productos de bacterias

gram-positivas y levaduras respectivamente), dinúcleotidos de DNA no metilados de citosina y guanina CpG (DNA CpG) (originario de bacterias y virus), RNA de cadena doble (producto viral) y flagelina (una proteína bacterial) (3).

El sistema inmune a través del reconocimiento de los PAMPs distingue microorganismos propios de los no propios (15). las mutaciones o la pérdida de función de estas moléculas pueden ser letales para los microorganismos, por lo tanto es esencial mantener una tasa de mutación baja; por último estos patrones moleculares son invariables entre microorganismos de la misma clase (29).

Sin embargo, para evitar la detección de estos PAMPs por los macrófagos algunas bacterias modifican su superficie modificando directamente las moléculas que activan la señalización por lo tanto las bacterias gram-negativas alteran su estructura de LPS durante una infección y evitan su reconocimiento o por péptidos antimicrobianos (30).

## **5.-TOLL EN *DROSOPHILA***

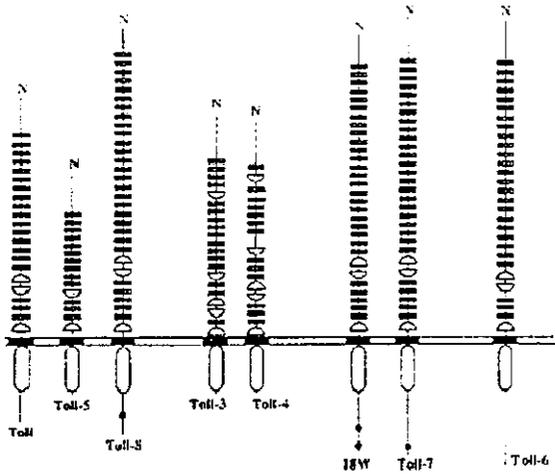
La RII realiza el reconocimiento de los PAMPs por medio de un conjunto de receptores/moléculas codificados de manera constitutiva o inducibles. Sus estructuras no cambian sin importar la variedad de patógenos con los que se puede encontrar (4, 29).

El reconocimiento de “microorganismos no-propios” parece ser una estrategia universal en el sistema inmune.

Esto se consigue por medio de Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs) que se expresan en células epiteliales y efectoras de la inmunidad innata que se encuentran con los patógenos durante la infección, tanto en vertebrados como en invertebrados.

Un ejemplo de estas moléculas son las proteínas Toll, receptores transmembranales de tipo I que fueron descrito en *Drosophila melanogaster* (5). Ahora se sabe que esta molécula intracitoplasmática consta de una porción extracelular y otra intracelular. El primer dominio consiste de Repeticiones Ricas de Leucina (RRL) mientras que su dominio citoplasmático muestra una increíble homología con el dominio (IL-R1) de la interleucina 1, llamado dominio Toll/IL-1R (TIR) (6) (Ver fig. 3).

La proteína Toll juega una función esencial en el desarrollo embrionario (3, 31, 7) y posteriormente se demostró su función en la respuesta de insectos contra infecciones causadas por hongos también como en la respuesta inmune (9).



Tauzing Servane *et al.* 2000 *PNAS*

Fig. 3. Receptores Toll de *Drosophila*

Durante los últimos años, se han identificado homólogos de esta proteína siendo al menos 9 (3), de lo cuales un mínimo de dos rutas activadas por Toll discriminan entre patógenos e inducen una respuesta efectiva del hospedero éstas son la ruta *Imd* y la *Toll* (7,

33. 9) (ver fig. 1). Estas rutas de señalización han demostrado ser fundamentales en la respuesta inmune contra la infección microbiana (34).

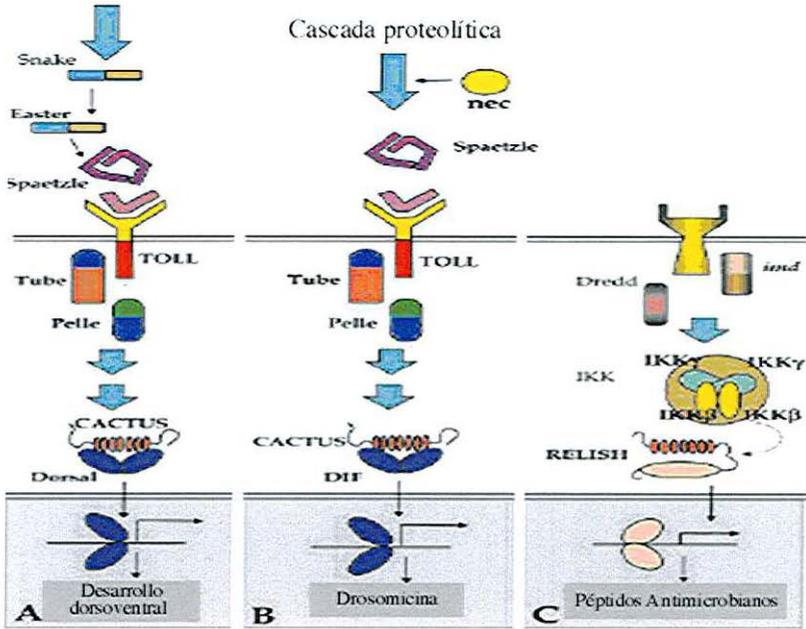
La señalización intracelular iniciada por los receptores Toll se debe a la unión de un ligando peptídico endógeno llamado Spatzel en el espacio extracelular. La activación de los receptores Toll genera el reclutamiento a la membrana intracelular de las proteínas adaptadoras Tube y Pelle para que finalmente permita la activación de la proteína parecida al Factor Nuclear de Transcripción  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) (Dorsal).

En la mosca se han identificado tres homólogos de NF- $\kappa\text{B}$ : Las proteínas Dorsal, Dif y Relish (35, 36).

La proteína I $\kappa\text{B}$  en moscas es conocida como Cactus y tiene la misma función de inhibir la activación de NF- $\kappa\text{B}$ . Sugiriendo que los mecanismos involucrados en la activación de los factores de transcripción Dorsal y Dif durante el desarrollo embrionario temprano y la actividad antifúngica son muy similares a aquellos requeridos en la activación de NF- $\kappa\text{B}$  en mamíferos.

Las moscas *Drosophila* que son naturalmente infectadas por hongos entomopatógenos muestran una respuesta de adaptación al producir sólo péptidos antimicrobianos con actividad antifúngica. Esta respuesta está mediada por la activación selectiva de la ruta de Toll (37). Que involucra al complejo (spatzle/Toll/cactus) y es conocida como ruta T1, esta tiene una gran similitud con la cascada de activación de NF- $\kappa\text{B}$  por la vía de las citocinas durante la respuesta inflamatoria, indicando que esta ruta de activación es una cascada primitiva involucrada en la defensa del huésped de insectos y

mamíferos en la que la síntesis de péptidos antimicrobianos involucra a la ruta *imd* genes de inmunodeficiencia y la combinación de Toll e *imd* (9) (ver Fig. 4).



Irving Phil. 2001 *PNAS*

Fig. 4. El receptor Toll al ser estimulado A) Diferenciación dorsoventral, B) Síntesis de antifúngicos, C) Síntesis de antimicrobianos.

La proteína Relish en la *Drosophila* tiene un dominio homólogo a Rel con una región N-terminal de un factor nuclear parecido NF- $\kappa$ B y un dominio C-terminal con repeticiones de ankirina parecido a I $\kappa$ B (39).

### 6.-TLRs EN MAMIFEROS

La caracterización funcional de los TLR ha permitido establecer que la inmunidad innata es un sistema muy dinámico que detecta la invasión de microorganismos patógenos. (8). En mamíferos, se han identificado proteínas estructurales homologas a Toll llamadas

Toll-like receptors (TLRs) (40). Los TLRs en mamíferos comprenden una familia que consta al menos de 11 miembros, los TLR 1-9 se conservan entre el humano y el ratón (41). Sin embargo a pesar de que el TLR10 es presumiblemente funcional en el humano, la mitad C-terminal del gen *Tlr* del ratón esta substituida por una secuencia no relacionada y no productiva indicado porque este TLRs no es funcional. Similarmente, el TLR11 en ratón es funcional, pero en humanos presenta un codon de terminación de transcripción, lo cual resulta en la falta de síntesis de TLR11 (42).

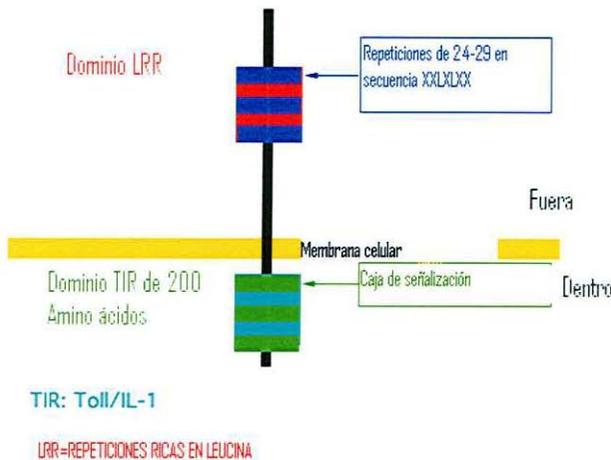
La primera evidencia de la función de los TLRs en mamíferos, fue descrita por la clonación posicional del gen *Ips* (43).

El gen *tlr* que codifica a sus respectivas proteínas, se localiza en los cromosomas 4p14(TLR1), 4q32( TLR2), 4q35(TLR3),9q32-33(TLR4),1q33.3(TLR5),4p16.1 (TLR 6),Xp22.3(TLR7), y 3p21.3(TLR9) (3).

Estos TLRs juegan un papel importante en la activación del sistema inmune, lo cual permite el control de la infección, la inflamación, además en la regeneración de tejidos y el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa (15; 44) y en la maduración del fagosoma en macrófagos (45)

Los TLRs de manera similar a Toll en moscas, son proteínas transmembranales tipo I constituidas por un dominio extracelular RRL involucrado directamente en el reconocimiento de una variedad de patógenos (31) y un dominio citoplásmico llamado TIR (3), encargado de activar la ruta de señalización para la síntesis de moléculas importantes en la respuesta inmune (ver fig. 5).

Este dominio se encuentra también en plantas, gusanos, artrópodos e incluso bacterias (29) por lo que este dominio de señalización evolucionó primitivamente (29, 3).

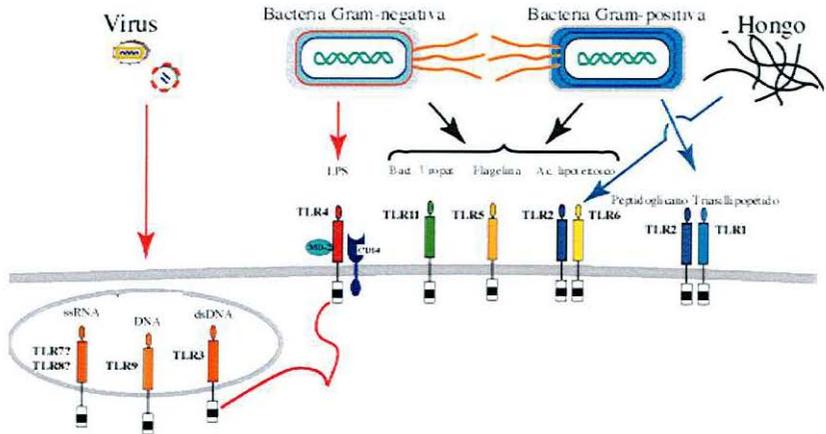


Modificado de [www.icampus.ucl.ac.be/.../TRLsignaling.html](http://www.icampus.ucl.ac.be/.../TRLsignaling.html)

Fig. 5. Morfología de la proteína Toll.

Una de las funciones principales de los TLRs es detectar los PAMPs y moléculas endógenas con función inmunoestimuladora, muchos de los ligandos de los TLRs fueron identificados en células embrionarias de riñón HEK293T, estas células son un valioso modelo para el estudio de su función, así como de la pérdida de expresión completa de cualquiera de los TLRs (47) (ver fig. 6).

Descubrimientos recientes han elucidado que los PAMPs no son exclusivamente reconocidos por un solo TLR como por ejemplo el TLR2 y TLR4 reconocen a PAMPs derivados de organismos gram-negativos (LPS) y un TLR puede responder a muchos ligando no relacionados, los cuales siempre se derivan de diferentes grupos de patógenos. El TLR4 reconoce componentes virales y LPS.



Modificado de [www.inet.uni2.dk/~iirrh/IIR/09inn/TLRSig.htm](http://www.inet.uni2.dk/~iirrh/IIR/09inn/TLRSig.htm)

Fig 6. Esquema que muestra los PAMPs y la activación de cada respectivo TLR.

En contraste, otros TLRs, como el TLR3, TLR5 y TLR9, parecen ser ligandos más específicos (49) e incluso existen TLRs que reconocen ligandos derivados del hospedero como es el dominio extra-A de la matriz extracelular de la proteína fibronectina y proteínas de shock térmico (Hsp). En ambos casos estas moléculas alertan a los TLRs de esta situación anormal. La activación de los TLRs por ligandos endógenos implica que ellos no distinguen entre propio y no-propio, si no que puede ser más la presencia de peligro la encargada de activar la respuesta y para esto puede presentar un carácter no-propio o propio dañino (12).

## REGULACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE LOS TLRs

Los estudios en los promotores de los genes *Tlr* han permitido identificar aquellos elementos reguladores genéticos que controlan la expresión, así como la transcripción de los genes de los TLRs en humanos y ratones (50). Existe el caso de TLRs que incluso

pueden presentar patrones de expresión subcelular específica, debido a la presencia de los ligandos microbianos que pueden introducirse en los espacios intracelulares, como es el caso de la activación de TLRs en macrófagos (51). Los TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 han mostrado expresarse en compartimientos intracelulares como en los endosomas (52, 53, 54) de los cuales el TLR3, 7 y 9 requieren de la maduración de estos organelos para reconocer a los PAMPs (51, 54, 55, 56, 58).

De acuerdo con sus patrones de expresión, los TLRs pueden ser:

- 1) Ubiquinoso (TLR1).
- 2) Restringido (TLR2, TLR4, y TLR5).
- 3) Específico (TLR3).

Interesantemente, la expresión de los TLRs declina con la edad, la cual es una posible explicación para la susceptibilidad del envejecimiento a las infecciones (59).

## **7.-TLR DEL 1-11**

Después del descubrimiento del primer TLR, la investigación se enfocó principalmente en estudiar la relación de estos receptores con el medio ambiente microbiano (60). Se ha establecido que los TLRs en mamíferos reconocen a los PAMPs por una interacción estrecha. Esta familia de receptores están especializados para funcionar solamente en la respuesta inmune (2, 16, 61). Como se mencionó anteriormente los PAMPs son representativos de bacterias, hongos y patógenos virales. Los TLRs en algunos casos requieren proteínas accesorias para el reconocimiento de los PAMPs como es el TLR4 (62). Los TLRs se presentan ya sea formando grupos, dímeros o aquellos que de manera individual pueden realizar su función.

**TLR 1, 2, 6** EL TLR2 es un receptor transmembranal que reconoce una gran variedad de componentes bacterianos. estos incluyen lipoproteínas/lipopeptidos de varios patógenos. peptidoglicanos y ácido lipoteicoico de bacterias Gram-positivas. lipoarabinosa de *Mycobacteria*. el glicosilfosfatidinositol de *Trypanosoma cruzi*. una modulina soluble en fenol de *Staphylococcus epidermis*. zimosan de hongos y glicolípidos de *Treponema maltophilum* (63). Enterobacterias no patógenas como *Leptospira interrogans*. *Porphyromonas gingivalis* y *Helicobacter pylori* (64.65. 66). reconoce además otros tipos de LPS de bacterias Gram-negativa debido al número de cadenas acilo en el lípido A (67) El hecho de que el TLR2 y TLR4 no reconozcan al mismo LPS se debe tal vez a que TLR2 forma heterodímeros con otros TLRs como el TLR1 y TLR6.

Las evidencias de esta unión se comprueban en macrófagos de ratones con TLR6-deficiente que no muestran producción de citocinas inflamatorias en respuesta a triacyl lipopéptido derivado de *Micoplasma*, pero lo hacen de diacyl lipopeptido derivado de Gram-negativa (68). Los macrófagos de ratón con TLR1 deficiente muestran lo contrario. no responden al triacyl lipopéptido, pero si responden a diacyl lipopéptido (69), por lo tanto el TLR1 y TLR6 se unen a TLR2 y discriminan entre estas dos moléculas. TLR1 puede inhibir la función de TLR6 (70). Otra demostración de esta interacción es la dimerización de algunos TLRs, tales como TLR4 o TLR5, siendo esto suficiente para la inducción de citocinas en una línea celular de macrófagos, mientras que TLR1 y TLR6, no inducen la sobre expresión de NF- $\kappa$ B. indicando que ellos no pueden señalizar como homodímeros (71, 72). Estudios con inmunoprecipitación revelan que TLR1 y TLR6 se unen con TLR2 y que esta interacción es necesaria para la producción de citocinas (72). Posteriormente estudios en ratón deficientes en TLR1, 2 y 6 demostraron que el TLR2 +/- tuvo una

respuesta baja hacia lipoproteínas de micobacteria y bacteria, mientras TLR1<sup>-/-</sup> y TLR6<sup>-/-</sup> no respondieron a uno de los dos PAMPs, demostrando que el TLR2 puede ser parcialmente atribuido a que forma heterodímeros con al menos otros dos TLRs y reconoce varios ligandos (73; 74). TLR2 es reclutado al fagosoma del macrófago (75)

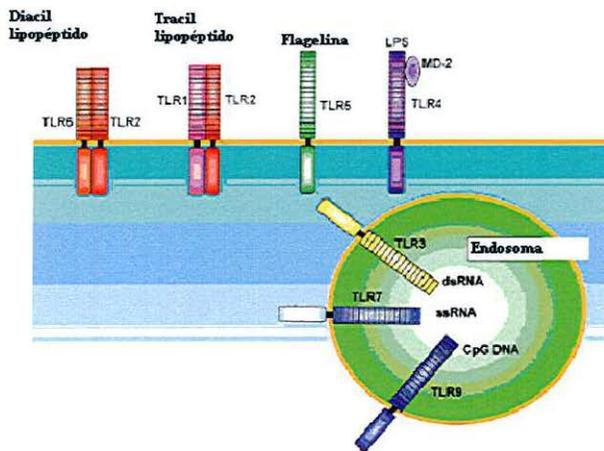
Además TLR1 ha mostrado estar involucrado en el reconocimiento de lipopéptidos de la membrana celular de *Borrelia burgdorferi* (76). El TLR2 reconoce componentes derivados de hongos (77), en el cual colabora con distintos tipos de receptores como Dectina-1 una familia de receptores  $\beta$ -glucanos componentes de la pared celular de hongos. La cooperación entre los TLRs no solo extiende el espectro de ligandos, incluso modula la respuesta a ligandos específicos (29). TLR1 se asocia con TLR4 e inhibe su señalización en células endoteliales (70), sugiriendo que el TLR1 puede tener una función más importante de regulación a través de la interacción con diferentes TLRs.

**TLR3** El receptor TLR3 está implicado en el reconocimiento de RNA de doble cadena (dsRNA) y virus. La expresión de TLR3 en una línea celular 293 de riñón que no responde al dsRNA le confiere un aumento en la activación de NF- $\kappa$ B. Además en ratones deficientes de TLR3 se muestra una respuesta desigual a dsRNA (78). El dsRNA es producido por la mayoría de los virus durante su replicación induciendo la síntesis de interferón del tipo-1 (IFN- $\alpha$ - $\beta$ ), el cual estimula actividades antivirales así como inmunoestimuladoras. El TLR3 muestra el patrón de expresión más restringido y se localiza principalmente en células dendríticas inmaduras (79).

**TLR4** Este receptor fue el primero en describirse al buscar secuencias similares a Toll y cómo primera función se descubrió que es esencial en el reconocimiento de LPS (43, 80), independiente de alguna molécula extracelular accesoria (83) específicamente el lípido

A (parte activa del LPS) (81, 82). Además, está implicado en el reconocimiento de Taxol un diterpeno purificado de la corteza del árbol tejo del oeste (*Taxus brevifolia*) (84, 85). El TLR4 ha mostrado estar involucrado en el reconocimiento de ligandos endógenos, cómo es el caso de la proteína de shock térmico (HSP60 y HSP70), el dominio extracelular A de la proteína fibronectina, oligosacáridos de ácido hyalurónico, heparan sulfato y fibrinógeno. Sin embargo son requeridas altas concentraciones de estas moléculas para activar el TLR4. El LPS es un inmunoadivador muy potente y a diferentes concentraciones es posible activar al TLR4.

En mamíferos el reconocimiento de LPS requiere a demás de TLR4 otras proteínas como: la proteína de unión a LPS (LBP), CD14 y MD2 (86, 87, 88) La molécula MD2 es una proteína pequeña que no tiene región transmembranal pero está asociada con el dominio extracelular de TLR4 (87) (ver fig. 7).



Takeda *et al.*, 2005 *International Immunology*.

Fig. 7. Lugar que ocupan los TLRs en la parte extracelular y en el endosoma.

**TLR5** Este receptor se expresa en células CHO y reconoce a la flagelina (89). La expresión de TLR5 se da en la parte basolateral, pero no en el lado apical de las células epiteliales del intestino (90), incluso su expresión se observa en los compartimentos subepiteliales de células endoteliales (91). Además la flagelina activa células epiteliales de pulmón, induciendo la producción de citocinas inflamatorias (92).

**TLR 7 y 8** Son proteínas muy conservadas que reconocen el mismo ligando en algunos casos. Análisis de ratones deficientes de TLR7 revelan que este receptor reconoce compuestos sintéticos, imidazoquinolinas, el cual es clínicamente usado para el tratamiento de verrugas en los genitales asociado con infección viral. El TLR7 murino ha mostrado reconocer otros compuestos sintéticos, como el loxoribine, el cual tiene actividades anti-virales y anti-tumorales. Sin embargo, el TLR7 y TLR8 humano reconocen una estructura parecida a los ácidos nucleicos que es una estructura de los virus, como es el caso del reconocimiento de RNA de cadena sencilla (ssRNA) rico en guanocina o uridina de virus como el HIV, virus de estomatitis vesicular e influenza virus. El ssRNA es abundante en el hospedero, pero usualmente el ssRNA derivado del hospedero no es detectado por TLR7 y TLR8. Esto se pudiera deber al hecho de que TLR7 y TLR8 se expresan en el endosoma y el ssRNA derivado del hospedero no es depositado en el endosoma. (8).

**TLR 9** El análisis de ratones deficientes de TLR9 revela que es un receptor para DNA CpG (93, 58). El DNA bacteriano contiene (motivos dinucleótidos no metilados CpG) que le confiere su actividad inmunoestimuladora, hay al menos dos tipos de DNA CpG, llamado DNA CpG tipo A/D y DNA CpG tipo B/K, este último es convencional, fue descubierto primero y es un potente inductor de citocinas proinflamatorias como la IL-12 y TNF- $\alpha$ . El tipo A/D es estructuralmente diferente al convencional tiene una gran habilidad

para inducir la síntesis de TNF- $\alpha$  en células dendríticas plasmocíticas (PDC), pero poco para inducir la IL-12 (56: 94). El TLR9 ha mostrado estar involucrado en el reconocimiento de ambos DNA CpG (93) y por tanto en infecciones virales. Además el TLR9 reconoce DNA CpG viral en PDC (95, 96) como en el caso de ratones con TLR9 deficiente, muestra una susceptibilidad a infección por citomegalovirus (MCMV) (97). En ratones el reconocimiento de MCMV en PDC u otro tipo de DC es dependiente de TLR9 a través de la activación de células NK (96). Esta localizado en el retículo endoplásmico antes de ser estimulado (98)

En el caso de una infección bacteriana, las células dendríticas y los macrófagos envuelven la bacteria por fagocitosis, entonces la molécula de DNA CpG es expuesta al degradar la bacteria en los fagosomas/lisosomas y/o endosomas/lisosomas, donde TLR9 es reclutado o expresado, en el caso de una infección viral las células inmunológicas invaden la célula por medio de receptores-mediadores de endocitosis, entonces su contenido viral es vertido en el espacio intracelular por la fusión de la membrana viral y endosomal, donde algunas veces son degradadas y presentadas a TLR9 moléculas como dsRNA, ssRNA, y DNA CpG (99).

**TLR11** Este receptor se ha identificado recientemente en ratones se expresa en células epiteliales urinarias y regula la resistencia a infecciones por bacterias uropatógenas (42). Los ratones deficientes del TLR11 son altamente susceptibles a infecciones por bacterias uropatógenas. Sin embargo el ligando no se ha sido identificado, estos descubrimientos indican que en el ratón TLR11 se encarga de la respuesta anti-uropatógena. En humano no se encuentran proteínas TLR11 funcionales, indicando que posiblemente perdieron uso en el ambiente y por lo tanto desaparecieron a través de la evolución (8).

## 8. EL MODELO DEL PELIGRO

Desde hace más de 50 años los inmunólogos han basado sus pensamientos, experimentos y tratamientos clínicos, en la idea de que la respuesta inmune funciona haciendo una distinción entre lo propio y lo no propio "self non-self" (SNS). El descubrimiento de las células presentadoras de antígeno APC trajo problemas de entendimiento a este modelo lo cual fue por mucho tiempo ignorado. Las APCs permitieron resolver problemas inmunológicos del antiguo modelo. Ahora son las APC las encargadas de reconocer lo foráneo, gracias a su propia forma de discriminación SNS y pueden reconocer patógenos evolutivamente distantes, mediante la vía de activación de los Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs) que reconocen a los PAMPs. Estos receptores ayudan a las APC a discriminar lo "infeccioso-no propio" y lo "propio-no infeccioso" sin embargo no fueron contestadas preguntas fundamentales de la inmunológica moderna por lo que resulto necesario entender mejor el mecanismo real de su funcionamiento (12).

Ahora parado sobre los hombros del modelo "propio no-propio" (SNS) y recientemente postulado por Polly Matzinger, se propone un nuevo modelo inmunológico llamado el "**modelo del peligro**", donde se sugiere la existencia de otra capa de células y señales, en la que las APC son activadas por señales de alarma producidas por células dañadas por patógenos, toxinas, daño mecánico entre otras y son estas señales las causantes de la activación de la RII ver Fig.8.

El modelo del peligro se basa en la idea de que la fuerza que dirige al sistema inmune es la necesidad de reconocer el peligro. Comienza con la idea de que el

sistema inmune define "peligro" como cualquier cosa que causa estrés en los tejidos o destrucción (100). En este modelo las señales de alarma no son provocadas por células sanas o por muerte fisiológica normal, por lo cual un microorganismo no es la característica importante para responder en contra de lo no propio y lo muy propio no es garantía de tolerancia (12). Este modelo se sustenta en el descubrimiento de señales de alarma endógenas (101), como lo son DNA de mamífero, RNA, proteínas de shock térmico (Hsp), interferon- $\alpha$  (proteínas inducibles después de infección viral), interleucina 1 $\beta$ , CD40-L (una molécula de superficie de plaquetas y células T) y derivados del hialurón, la lista de moléculas inmuno estimuladoras derivadas del huésped actualmente ha crecido y se conocen más. Estas moléculas que no son expuesta normalmente a los PRRs puede ser nombradas Patrón Moléculas Asociado Peligro (DAMPs) (102) y estos son expuesto debido a daños en células, órganos y tejidos o señales de peligro. Para esto los receptores TLRs pueden reconocer tanto moléculas endógenas (DAMPs) como exógenas (PAMPs) tales como el LPS y el PGA, son específicos para microorganismos y no se encuentran en ningún organismo multicelular y utilizan los mismos receptores que para la traducción de señales.

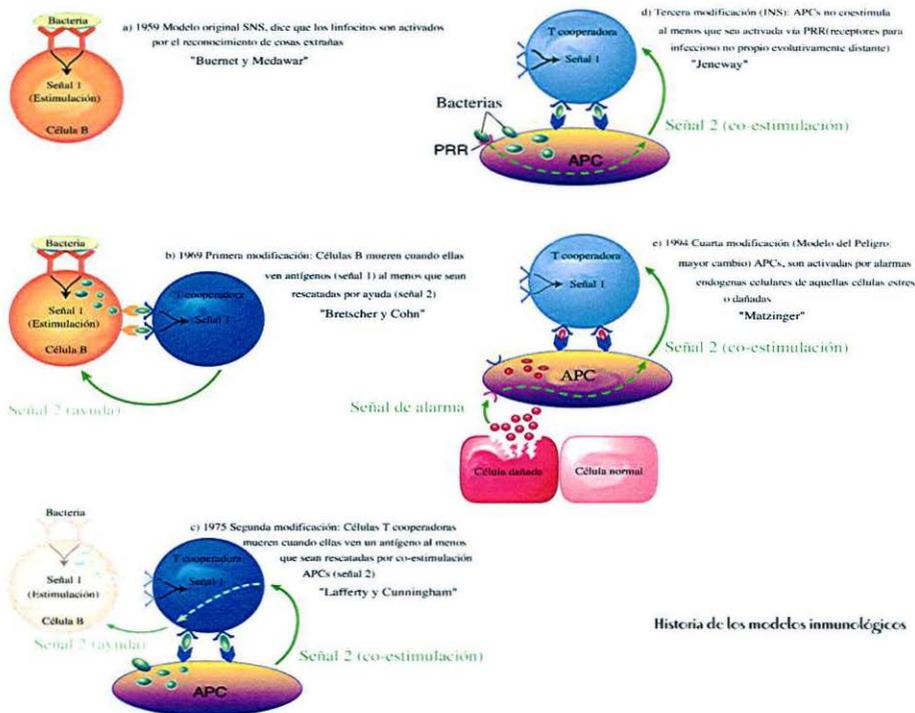
Nosotros nos acercamos al sistema inmune desde un punto de vista propio-no propio, sin embargo esto cae fácilmente cuando nos acercamos desde la perspectiva de que el sistema inmune esta más relacionado con peligro y destrucción potencial que con la distinción propio-no propio.

Las proteínas de la matriz extracelular son siempre degradadas proteolíticamente durante una infección para facilitar el acceso de macrófagos y otras células efectoras del SI al sitio de infección. El dominio A (EDA) de la fibronectina, es inducido solo en tejido

dañado. Las proteínas de shock térmico se expresan normalmente en el citoplasma y no pueden estar en contacto con los receptores de superficie sin embargo pueden ser expulsados al espacio extracelular por células necróticas durante el daño tisular o una infección viral.

Debido a que los inmunoestimuladores endógenos no se habían considerado en el modelo de discriminación propio-no propio se propone el modelo del peligro con la finalidad de reconciliar las contradicciones entre los dos modelos. La diferencia principal es que en el modelo de Jenaway sugiere que estos agentes inmunoestimuladores deben ser no-propios (el modelo "extraño") mientras que, el modelo del peligro menciona que son las moléculas propias asociadas con el estrés y el daño celular (102). Esto quiere decir que las células del sistema inmune innato como los macrófagos, células dendríticas y polimorfas nucleares, pueden reconocer señales derivadas de tejidos en ausencia de patógenos, también como patógenos en la ausencia de señales derivadas de tejidos (ver fig. 8).

Una posibilidad es que estemos viendo a los PRR al revés (12), como si este tipo de receptores hubieran evolucionado para unirse a los PAMPs, puede ser que los patógenos evolucionaron para unirse a los PRRs como los TLRs en el caso del virus del VIH que se une a CD4,CCR5 y CxCR4 etc. y en estos casos ninguno sugiere que haya evolucionado para unirse a este virus, si no que el patógeno a evolucionado para unirse a TLRs, al parecer este virus es el que recibe el beneficio.



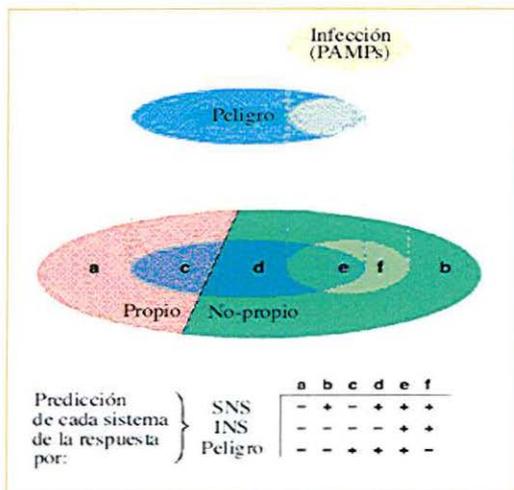
Historia de los modelos inmunológicos

Matzinger P. 2002 *Science*.

Fig.8. Historia de los modelos inmunológicos, con sus células y moléculas, incluyendo el modelo del peligro

Algunas veces el PRR puede ser mal nombrado como en el CD14 que reconoce células apoptóticas y reconoce al LPS, sin embargo ratones sin CD14 responden más vigorosamente que ratones normales a LPS (12) sugiriendo que la interacción CD14-LPS es más favorable para el patógeno que para el hospedero. Tal vez los TLRs originalmente evolucionaron como receptores relacionados con señales de peligro y posteriormente los microorganismos evolucionaron los mecanismos para usar estos receptores y mejorar su sobrevivencia y por lo tanto el que los TLRs reconozcan tan diversos tipos de moléculas de

igual número de patógenos y que estos últimos por sus propios medios desarrollaron la capacidad de unirse a los TLRs sugirieren que nuestro sistema inmune puede usar los TLRs y otros receptores para responder a señales originadas por multipropósitos de estrés que puedan interactuar con la barrera celular y intracelularmente (ver Fig. 9).



Matzinger P. 2002 *Science*

Fig.9. Los PAMP's y su función en el modelo del peligro

## 9.-RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DE LOS TLRs

Los receptores TLRs reclutan y activan moléculas adaptadoras intracelulares y quinasas para la transducción de señales intracelulares, por ejemplo el dominio TIR de todos los TLRs se requieren en muchos casos para la señalización de la ruta NF-kB/mitogeno activador de la proteína kinasa.

Las células de las plantas también presentan moléculas con repeticiones ricas en leucina, dominios TIR y uniones de multidominios de proteínas por medio de kinasas serina-teonina. esto permite inferir que tal vez estos mecanismos ya eran utilizados por ancestros comunes a plantas y animales y que los han protegido de infecciones por más de mil millones de años (7).

Existen dos vías de señalización, la vía dependiente e independiente de MyD88. La ruta intracelular que se activa de manera general debido a la estimulación de los TLRs es por medio de la proteína MyD88 (103).

### **RUTA DE SEÑALIZACIÓN DEPENDIENTE DE MyD88**

La ruta de señalización a través de los receptores TLRs, es muy homóloga a los receptores de la familia IL-1(IL-1R). Ambos interactúan con una proteína adaptadora llamada MyD88 en su dominio TIR y en un dominio de muerte N- terminal. Cuando se estimula MyD88 es reclutado el receptor asociado a quinasa IL-1 (IRAK), de estos se conocen al menos 4 diferentes proteínas.

La proteína IRAK4 activa por fosforilación a IRAK1 que a su vez se asocia con TRAF6, permitiendo la activación de dos rutas de señalización distintas, AP-1 a través de la ruta MAP quinasa y el complejo de los miembros de la familia de las kinasas1 asociadas a activadores de NF- $\kappa$ B (TAK1/TAB). El blanco para esta quinasa es otra quinasa fabricada de dos cadenas, llamada I $\kappa$ B quinasa  $\alpha$  (IKK $\alpha$ ) y I $\kappa$ B quinasa  $\beta$ (IKK $\beta$ ), que juntas forman un heterodimero de IKK $\alpha$ : IKK $\beta$ , el cual fosforila I $\kappa$ B y aumenta la actividad del complejo I $\kappa$ B quinasa (IKK), una vez activado este último complejo, se induce la fosforilación y

subsiguiente degradación de I $\kappa$ B el cual permite la translocación del factor nuclear de transcripción NF- $\kappa$ B (103, 104).

En ausencia de TLR2/4 o MyD88, no se presenta una maduración del fagosoma (105), esto fue demostrado por los experimentos en los que el TLR-es mediador de la activación de la proteína involucrada en la apoptosis p38 dependiente de MyD88. Ratones deficientes de MyD88 no mostraron respuesta inflamatoria a LPS, a la producción de mediadores de la inflamación producidos por los macrófagos que estimulan la proliferación de células B y al shock por endotoxinas (106). La respuesta celular a peptidoglicanos y lipoproteínas no se presenta en ratones deficientes de MyD88 (68) Además células deficientes de MyD88 no muestran ninguna respuesta hacia DNA CpG (107, 108) y por último ratones deficientes de MyD88 son resistentes al síndrome de shock inducido por la flagelina (71).

Los macrófagos deficientes de TIRAP (proteína adaptadora conteniendo dominio TIR) /Mal (adaptador parecido-MyD88) muestran producción de citocinas proinflamatorias en respuesta a los ligandos de TLR2 y TLR4 (109). Pero no respondieron igual a TLR3, TLR5, TLR7 y TLR9, mostrando su importancia en las vías de señalización dependientes de MyD88 (8).

### **RUTA DE SEÑALIZACIÓN INDEPENDIENTE DE MyD88**

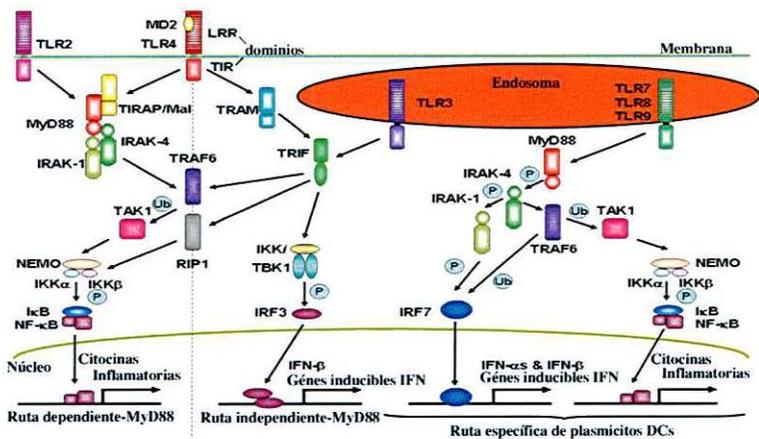
La existencia de una ruta de señalización independiente de MyD88 en TLR4 se ha observado debido a la activación de los factores de transcripción JNK y NF- $\kappa$ B en ratones deficientes de MyD88 (110).

Por otro lado en una infección viral con ssRNA se activa la ruta del TLR3 que a su vez induce a IRF-3 para sintetizar el IFN- $\beta$  de manera independiente de MyD88, por lo tanto el TLR3 y TLR4 utilizan componentes independientes de MyD88 (111).

La vía independiente de MyD88 es regulada por moléculas que contienen dominios TIR, como la que contiene un adaptador de inducción del IFN- $\beta$  (TRIF) (112), cuando se asocia a TLR-3 recibe el nombre de dominio TIR que contienen moléculas adaptadoras (TICAM-1) (113), en ratones deficientes de TRIF/TICAM-1 no muestran activación del factor de transcripción IRF-3 y una expresión no uniforme de IFN- $\beta$  y de genes inducibles por IFN en respuesta a ligandos de TLR3 y TLR4, por lo que se entiende que TRIF es esencial en la ruta de señalización independiente de MyD88.

La identificación de un cuarto dominio TIR que contiene un adaptador, fue llamada molécula adaptadora relacionada con TRIF nombrada (TRAM)/TICAM-2 (113, 114, 115, 116), TRAM está involucrado en la activación de IRF-3 y la inducción de genes de IFN y IFN- $\beta$  por la vía TLR4, pero no por TLR3 (114,117,113) por lo que TRAM es esencial en la ruta de señalización de TLR4 independiente de MyD88/dependiente de TRIF.

Otro adaptador necesario en la ruta de señalización independiente de MyD88 es un TIRAP y es la molécula encargada de la activación de la ruta de señalización de TLR4 (109) (ver fig. 10).



<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/act/images/akiraB.png>

Fig.10. La ruta de señalización que activa a los TLRs.

## REGULACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN DE LOS TLRs

La estimulación de los TLRs por los PAMPs activa la inducción de citocinas inflamatorias tales como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12, cuando estas citocinas son producidas en exceso, inducen severos problemas sistémicos con una alta tasa de mortalidad. La exposición al LPS en repetidas ocasiones ocasiona una disminución en la respuesta subsecuentes a esta molécula y es conocida desde hace 50 años y nombrado tolerancia endotoxina (LPS) (119) una opción es que la estimulación de macrófagos por el LPS reduzca la expresión del complejo de receptores para LPS, TLR4 y MD-2 (cofactor que facilita la unión de LPS a TLR4) (1120,121) además la estimulación de TLR2, TLR4 y TLR7 disminuye la expresión de IRAK-1 (122,123). También han sido descubiertas moléculas involucradas en el control negativo de la ruta de señalización de los TLRs como el caso de IRAK-M que es inducido por la estimulación de TLRs en monocitos/macrófagos (124,125)

## REGULACIÓN EN LA TRASCRIPCIÓN QUE INVOLUCRA A LOS RECEPTORES TLRs

Los receptores TLR activan varias rutas de señalización de síntesis de moléculas blanco por medio de los factores de transcripción JNK/AP-1, cascada de caspasas proapoptóticas y NF- $\kappa$ B inducible (10: 105,126, 127).

La activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B por medio de la ruta de señalización de los TLRs es una parte clave en la regulación inmunológica e inflamatoria (35). Este mecanismo está presente de manera muy conservada evolutivamente, ya que se presenta filogenéticamente en especies que van desde los insectos hasta los mamíferos (35, 128, 129).

La expresión del factor NF- $\kappa$ B se presenta de manera selectiva y está involucrada en la regulación de muchos genes que forman parte en los procesos apoptóticos e inflamatorios (36, 130). La activación del NF- $\kappa$ B se presenta después de la estimulación de productos microbianos como los PAMPs, citocinas proinflamatorias, mitógenos de células T y B, así como por estrés físico y químico. Los genes que regula el NF- $\kappa$ B por ejemplo, son las citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF $\alpha$ , LT $\alpha$ , LT $\beta$  Y GM-CSF) quimiocinas, moléculas de adhesión (ICAM, VACAM, moléculas de adhesión leucocito-endotelial (ELAM)) proteínas de fase acuosa (SAA), péptidos antimicrobianos (36,130).

Además de regular la respuesta inmune innata el factor NF- $\kappa$ B está involucrado en la expresión de moléculas importantes para la activación y mantenimiento de la respuesta adaptativa, cómo son las proteínas del MHC y la expresión de citocinas críticas tales como IL-2, IL12 e IFN- $\gamma$  (36).

## 10.-SÍNTESIS DE PEPTIDOS NATURALES ANTIMICROBIANOS

Los Péptidos Naturales Antimicrobianos (PNAs) son un grupo diverso de moléculas que son producidas por muchos tejidos y células en invertebrados, plantas y animales. Su composición de amino ácido, su anfipatia, carga cationica y tamaño, les permiten unirse o insertarse en la bicapa lipidia de la membrana bacteriana para formar poros y matarlos. Se han aislado cerca de 850 péptidos diferentes (131), estas moléculas son divididas en subgrupos basándose en su composición y estructura de aminoácidos:

Un subgrupo contiene péptidos antimicrobianos aniónicos con un peso molecular de 721.6-823.8 Da, son producidos en concentraciones de mM, y requieren zinc como un cofactor actuando en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

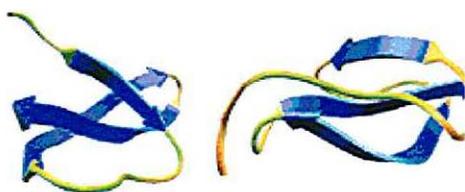
Un segundo grupo contiene ~290 péptidos catiónicos regularmente muy cortos de <40 aminoácidos, sin residuos de cisteina.

Un tercer subgrupo contiene ~44 péptidos catiónicos que son ricos en ciertos aminoácidos, estos péptidos no tienen residuos de cisteina y son lineales.

Un cuarto subgrupo de péptidos aniónicos y cationicos tiene ~380 miembros, contiene residuos de cisteina y forma puentes disulfuro y plegamientos- $\beta$  estables (132).

Un ejemplo de estas moléculas son las denominadas Defensinas, estos Péptidos antimicrobianos están compuestos por una secuencia de 29-35 a.a., se encuentran en muchas especies de mamíferos presentandose abundantes en neutrofilos, células blancas fagocíticas que circulan en la sangre (ver figura 11).

Los péptidos antimicrobianos  $\alpha$  y  $\beta$ -defensina se expresan en una gran variedad de tejido epitelial, el cuál sirve cómo el primer sitio de encuentro bacteriano (132). Los neutrófilos y macrófagos son ricos en defensinas, numerosas defensinas han sido aisladas en altas concentraciones de neutrófilos (133) de manera constitutiva e inducida (133). La expresión de las defensinas se presenta como un factor importante en el mantenimiento del balance de la actividad antimicrobiana. Los experimentos han permitido observar que los genes del homólogo humano de defensina-2 (hBD2) al ser estimulados por LPS con el receptor CD14 resulta en un incremento de la actividad de NF- $\kappa$ B (134; 135)



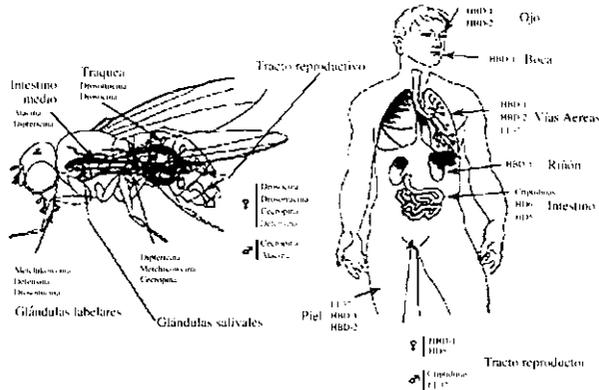
Hoffmann *et al.* 1999 *Science*

Fig.10. Estructura tridimensional del péptido antimicrobiano defensina a)  $\alpha$ - Defensina b) $\beta$ -Defensina

El hBD-2 se expresa de manera inducible en una variedad de células epiteliales como en vías aéreas, piel, mucosa oral, riñón y tracto gastrointestinal (136, 137, 138 139, 140; 141, 142, 143).

Actualmente se ha visto la participación de los TLRs en la activación de péptidos naturales antimicrobianos. El TLR2 en células epiteliales traqueobranqueales de humano

induce la expresión de  $\beta$ -Defensina-2 (HBD-2) a través de NF- $\kappa$ B (144, 135) (ver figura12).



Phoebe, T. et al. 2000 Immunity

Fig. 11. Expresión de diferentes PNA tejido-específico en *Drosophila* y Humano.

El reconocimiento de los PAMPs por los TLRs en células NK humanas activa la producción de la  $\alpha$ -defensina (146). Estas células participan en la respuesta inmune en contra de microorganismos pero su manera de activación se ha mantenido sin descubrir. Estas células codifican miembros de la familia de los receptores TLRs y cuando fueron estimuladas con el PAMP, KpOmpA y flagelina de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* respectivamente mostraron una expresión inducida de  $\alpha$ -defensina, demostrando una nueva y directa ruta citotóxica involucrada en la protección contra microorganismos. durante los últimos años a crecido mucho la cantidad de PNA aislados y ahora se sabe el tejido o célula en la que se expresa ya sea de manera inducible o constitutiva y el elemento regulador involucrado. (ver tabla 1 ).

**Tabla 1.  $\alpha$ -Defensinas de mamíferos**

Nombre	Organismo	Tejido	Inducibilidad	Elementos regulatorios
HD5-6	Humano	Genitourinario, tracto GI	Constitutivo	NF II,-6
HNP		Neutrofilo	Constitutivo	CZEBPa
mCP-1-2	Conejo	Macrófago alveolar	Constitutivo	ND
Criptidina	Rata, ratón	Tracto GI	Constitutivo	ND
TAP	Vaca	Traquea, macrófago alveolar	Inducible	NF-κB,NF II,-6
LAP	Vaca	Lengua, traquea	Inducible	NF-κB,NF II,-6
EBD	Vaca	Intestino delgado	Inducible	NF II,-6
BNBD 4	Vaca	Neutrofilo, macrófago alveolar, traquea, colon, intestino delgado distal	Constitutivo	ND
BNDB5	Vaca	Neutrofilo, macrófago alveolar	Constitutivo	ND
BNDB 12.13	Vaca	Neutrofilo, traquea, colon, intestino delgado distal	Constitutivo	ND
BNBD1-3,6-11	Vaca	Neutrofilo	Constitutivo	ND
sBD-1	Oveja	Tracto GI, traquea	ND	ND
sBD-2	Oveja	Tracto GI	ND	ND
hBD-1	Humano	Tracto GI, mucosa oral, páncreas, riñón, colon, pulmón, traquea, intestino delgado	Constitutivo	ND
hBD-2	Humano	Piel, pulmón, mucosa oral, ojo, traquea, intestino delgado	Inducible	NF-κB
mBD-1	Ratón	Pulmón, riñón, corazón, tripas, macrófago alveolar, órganos reproductivos femeninos	Constitutivo	ND
mBD-2	Ratón	Riñón, útero, corazón, Vías aéreas	Inducible	ND
mBD-3	Ratón	Intestino delgado, pulmón, hígado	Inducible	ND
pBD-1	Cerdo	Vías aéreas, tracto GI, mucosa oral, lengua	Constitutivo	ND

ND= No determinado

Referencias en Kaiser y Diamond 2000 *Journal Of Leucocyte*

GI= Gastro intestinal

## 11-PATOLOGIAS QUE INVOLUCRAN A LOS RECEPTORES TLR

El hospedero es una entidad en la cual los microorganismos invaden y provocan una alteración en los mecanismos homeostáticos normales del funcionamiento de las células, tejidos y órganos.

El mecanismo de la señalización mediada por los TLRs en enfermedades humanas es algo complejo debido a los factores ambientales y a las diferencias genéticas entre los

seres humanos. Sin embargo estudios de un polimorfismo específico en los genes que codifican los TLRs o sus moléculas de señalización pueden elucidar la relación entre la señalización de TLRs y las enfermedades humanas. Por ejemplo, en el TLR4 la sustitución de un amino ácido del ácido aspártico por una glicina en la posición 299 (D299G). Este polimorfismo se identificó por primera vez con un decremento en la respuesta hacia el LPS de bacterias inhaladas en el polvo. Subsecuentemente otros polimorfismos en el TLR4, TLR2 y en genes que codifican para otras moléculas como IRAK-4, NEMO,  $I\kappa B\alpha$  y caspasa-12 (Csp-12) han demostrado que la señalización de los TLRs afecta el desarrollo y progresión de muchas enfermedades humanas (30)

Muchas líneas de experimentación han demostrado que los TLRs están implicados en desordenes inflamatorios e inmunológicos (8).

Como por ejemplo, la activación constitutiva de células por medio del TLR4 causada por la señalización deficiente de IL-10 resulta en el desarrollo de enterocolitis crónica (63). La ruta de señalización dependiente de MyD88 está involucrada en el rechazo a los injertos (147) y también en la aterosclerosis (148). El reconocimiento de bacterias comensales ha mostrado jugar un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis intestinal (149).

Un polimorfismo en TLR5 a mostrado estar asociado con la susceptibilidad a neumonía, causada por la bacteria flagelada *Legionella pneumophila*.

El TLR9 se sugiere estar involucrado en desordenes patológicos tales como enfermedades autoinmunes debido a su función antiinflamatoria. Lo cual está correlacionado con la susceptibilidad a patógenos, sin embargo los diferentes

polimorfismos de los TLRs puede contribuir más a alterar la respuesta del hospedero a patógenos (150).

Pocas enfermedades han causado tanta devastación en la historia humana como *Yersenia pestis*, el agente etiológico de la peste negra. Este microorganismo es transmitido regularmente por la mordedura de una rata. Los patógenos de *Yersenia spp.* Reitan de la habilidad para resistir la defensa innata del hospedero así como la fagocitosis y la inducción de moléculas antimicrobianas (62).

Algunas bacterias para evitar ser detectadas por los macrófagos, modifican sus superficies para camuflarse o directamente modificar las moléculas que activan la señalización de los TLRs. Algunas bacterias Gram-negativas pueden alterar su estructura de LPS durante la infección, para ser detectadas de una manera inconsistente o para protegerse a sí mismo de la producción de los péptidos antimicrobianos (30).

La bacteria *Pseudomona aeruginosa*, causa infección crónica en los pulmones de pacientes que padecen fibrosis quística, este microorganismo cambia su estructura del LPS durante la enfermedad y es reconocido por el receptor humano TLR4 como algo diferente. Durante el inicio de la interacción del patógeno con el hospedero, la expresión del LPS por la bacteria es un lípido A penta-acilado, éste influye en la producción de TNF- $\alpha$  e IL-8, en cantidad 100 veces menor en comparación con el LPS hexa-acilado; así evita la producción de citocinas importantes en el reclutamiento de células al sitio de la infección y la activación de las defensas antimicrobianas del macrófago, e inicia la colonización de los pulmones, posteriormente en la infección es cuando se sintetiza el LPS hexa-acilado activando una fuerte respuesta inflamatoria cuando es reconocido por el TLR4 (151).

## SEPSIS

La sepsis y su más severa forma el shock séptico, representa un síndrome asociado a infección bacteriana, la mayoría de los casos de sepsis es causada por bacteria Gram-negativas, esta infección se debe a las enterobacterias *E. coli* y *Klebsiella*: afecta al pulmón, abdomen, torrente circulatorio y tracto urinario. En la sepsis causada por Bacterias Gram-positivas, las principales responsables son el *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae*: afectando la piel y tejidos blandos, así como el torrente circulatorio y aparato respiratorio (152). En humanos el polimorfismo del TLR4 D299G es un riesgo de sepsis así como un incremento de incidencia del síndrome de inflamación sistémica (153). El TLR2 y su polimorfismo R753Q está asociado con un decremento en la respuesta hacia los péptidos bacterianos de *Borrelia burgdorferi* y *Treponema pallidum* y este mismo polimorfismo puede predisponer a infección por *Staphylococcus* o tuberculosis (154). Sin embargo, otro polimorfismo R677W activa al NF- $\kappa$ B por *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium tuberculosis* (155,156,157).

Una alteración en la señalización de los TLRs afecta el reconocimiento innato de bacterias y el inicio de una respuesta inmune adaptativa debido a una sobre estimulación de los TLRs o la expresión de otras moléculas adaptadoras como es el caso de IRAK-M generando una tolerancia hacia el LPS.

Un Polimorfismo en IRAK-4 está asociado con una baja respuesta contra infecciones bacterianas. Este polimorfismo incluye un cambio en el codón de terminación en la posición 287 y 293 de IRAK-4.

Un polimorfismo en la Caspasa-12, TGA en el codón de terminación resulta en una forma larga de esta proteína (Csp-12L), este polimorfismo causa una no respuesta al LPS,

teniendo un alto incremento en la incidencia de sepsis y de mortalidad una vez que la enfermedad se ha desarrollado.

En pacientes con sepsis las células T y B apoptóticas podrían contribuir a la inmunosupresión (158). El TLR4 requiere de MyD88 y TIRAP cuando éste es mediador de la apoptosis (159) y puede ser incluso inducida directamente por la síntesis de productos de secreción como los glucocorticóides.

## **INMUNODEFICIENCIAS**

Las Inmunodeficiencias ocurren cuando existe una desregulación en uno o más componentes del sistema inmune. Las inmunodeficiencias se clasifican como primarias y secundarias. Las primarias son causadas por mutaciones en genes que controlan la expresión y las actividades de la respuesta inmune. La mayoría de las inmunodeficiencias primarias se presentan clínicamente como recurrentes infecciones en niños y jóvenes, sin embargo muchos síntomas se muestran en la edad adulta. En contraste, las inmunodeficiencias secundarias son adquiridas como una consecuencia de otras enfermedades, por factores ambientales, desnutrición, o por una intervención médica.

Un ejemplo de alteración es observado en la enfermedad de la displasia exodermal anhidrica, que se origina en algunos casos por la mutación autosómica de los genes que codifican para la molécula  $I\kappa B\alpha$ , evitando su degradación y posterior unión a  $NF-\kappa B$  (160).

## **ATEROSCLEROSIS**

La aterosclerosis significa literalmente endurecimiento de las arterias; pero con más precisión es un término genérico que engloba a tres clases de enfermedades vasculares que tienen en común el engrosamiento y la pérdida de elasticidad de las paredes vasculares. La

forma más frecuente es la aterosclerosis, caracterizada por la formación de placas fibrosas en la íntima (161).

El polimorfismo D299G en el TLR4 está asociado con una reducción en el riesgo en la arterosclerosis de la arteria carótida (162) y en eventos coronarios agudos (163). Este polimorfismo presenta incluso una disminución en la concentración de proteínas proinflamatorias, IL-6, fibrinógeno y Molécula soluble 1 de adhesión a células vasculares. Estas moléculas están asociadas en el desarrollo de la inflamación a su vez con la progresión de la arterosclerosis, la ruptura de plaquetas y consecuente oclusión de vasos. Una interpretación que se ha podido hacer de la mutación D299G es que tiene beneficios en cuanto a la disminución de la respuesta inflamatoria y que son mayores los riesgos por infección a las que está asociada. El descubrimiento de que la proteína de shock térmico 60 (HSP60) de *Chlamydia pneumoniae* puede activar la ruta de señalización de TLR4 importante en las enfermedades vasculares, debido a que HSP60 se encuentra en lesiones de arterosclerosis y es reconocido por el TLR4 lo cual puede exacerbar la inflamación mientras que el polimorfismo D299G protege de esta inflamación exagerada (160).

## **AUTOINMUNIDAD**

El Lupus Eritomatoso Sistémico (SLE) es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por presentar anticuerpos en contra de antígenos propios, incluyendo el reconocimiento de los ácidos nucleicos. El mecanismo involucrado en esta enfermedad podría estar relacionado con la ruta de señalización del TLR9, ya que el DNA de los mamíferos puede estimular este receptor cuando se presenta en forma de inmunocomplejos y se encuentran comúnmente en la circulación de los pacientes SLE (160).

## **12.-PERSPECTIVAS Y DISCUSION**

En mamíferos la identificación de los TLRs ha verdaderamente revolucionado el campo de la patogénesis microbiana y la inmunología (29). Un entendimiento completo de los mecanismos de la inmunidad innata podrían ayudar en un futuro a desarrollar terapias para la manipulación de enfermedades infecciosas, cáncer y alergias entre otras. Actualmente se requieren de más estudios para entender la conexión entre la inmunidad innata y la adquirida, como en el caso de los trasplantes de tejidos, los estudios con TLRs han permitido mostrar que es la RIA la que predomina en el rechazo, aunque se desconocen las proteínas claves y células involucradas (8).

Recientemente se ha demostrado la importancia entre la ruta de señalización de los TLRs y las enfermedades humanas. Sugiriendo que la manipulación en esta ruta tiene grandes potenciales terapéuticos, aunque por otro lado podría alterar la respuesta inmune (160). Por ejemplo, antagonistas de los TLRs o sus moléculas de señalización pueden ser utilizados como vacunas.

El estudio de los polimorfismos de los TLRs es de gran importancia al considerar varias opciones de terapia o preveer la susceptibilidad a enfermedades.

Nuestro entendimiento de la ruta TOLL-LBP-CD14 puede ser de importancia en el diseño de nuevos tratamientos del shock séptico.

Por ejemplo la activación de TLR7, TLR8 y TLR9 permite la inducción de IFN- $\alpha/\beta$  por una vía de señalización dependiente de MyD88 en PDC el estudio de estas rutas son de mucho interés. Aun quedan muchas preguntas por resolver algunas de las más relevantes pueden ser aquellas relacionadas con la especificidad de ligandos de los diferentes TLRs. también se puede pensar en como es que la respuesta se da de una manera selectiva, los TLRs podrán distinguir entre patógenos intracelulares y extracelulares y si es posible

distinguir microorganismos patógenos de comensales y si los microorganismos patógenos son capaces de desarrollar estrategias para evitar ser detectados por los TLRs, esto es algo de lo generado con las investigaciones en el tema.

Los laboratorios farmacéuticos están interesados en los TLRs y sus proteínas de señalización asociadas, ya que podrían operar como blancos farmacológicos en el tratamiento de infecciones y trastornos inmunes. Con la expansión de la resistencia a antibióticos, la aparición de virus nuevos y más virulentos y la creciente amenaza bioterrorista, la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos que ayuden a nuestro organismo a luchar contra infecciones resulta inminente (160).

El modelo del peligro esta ayudando a resolver muchos de los problemas contemporáneos en la inmunología, así el estudio de la RII retomado hace unas 3 décadas ha permitido descubrir los trabajos de Eli Metchnikov y entender su carácter sencillo pero fundamental de los mecanismo que orquestan la RI así como valorar la jerarquía de este mecanismo innato de defensa y sus implicaciones en patologías y procesos fisiológicos a los cuales no se les encontraba relación. Nos ha permitido apreciar la jerarquía de la RII como primera barrera de defensa de suma importancia para el mantenimiento de la vida del hospedero, además de ser un campo que nos permitirá pensar de una nueva manera el funcionamiento de la relación huésped-hospedero gracias a el Modelo del peligro que se coloca en el estado del arte de esta complejamente innata relación con nuestro ambiente biótico y abiótico.

Este modelo es un gran avance en nuestro entendimiento de la activación de la RI tanto innata como adaptativa y de cómo el principio del SI es detectar el peligro y no propiamente aquello que no sea propio.

Uno de los descubrimientos que le han dado respaldo a este modelo del peligro son los TLRs, por su capacidad de reconocer DAMPs generadas por celular, tejidos y órganos debido que han sido dañados y de las cuales estas moléculas funcionan como señales de peligro.

Este mecanismo de reconocimiento se encuentra en todos los mamíferos, insectos, y plantas descubriendo su antiguo origen evolutivo y de lo fundamental que es para un organismo en su acondicionamiento.

### **13.- CONCLUSIONES**

1.- Las perspectivas de trabajo en los siguientes años incluyen la identificación de hasta dónde se ha avanzado en el conocimiento de la regulación de la producción y actividad de los péptidos antimicrobianos, su función, de tipo convencional o no convencional, y la síntesis y mimetismo de estas moléculas.

2.- La interacción hospedero-parásito en las superficies epiteliales recibirá mucha atención por parte de los investigadores en el mundo.

3.- El reconocimiento de bacterias patógenas y la patogénesis misma, así como la resistencia serán temas prioritarios para la aplicación clínica y el entendimiento de su modo de acción.

4.- Todo lo anterior pone claramente en la visión científica la evolución de la RII como elemento integrador de los sistemas de defensa de todos los seres vivos.

### 13.-BIBLIOGRAFIA

- 1.-Hoffmann J A, Reichhart J M. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat Immunol* 2002; **3**: 121-126.
- 2.-Kiyoshi T, Akira S. Toll-Like Receptors. *Annu Rev Immun* 2003; **21**: 335-376.
- 3.-Uthaisangsook S, Day N, Bahna S, *et al*. Innate immunity and its role against infections. *Ann Aller Asth Immu* 2002; **88**: 253-265.
- 4.-Janeway J. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989; **1**: 1-13.
- 5.-Andersen K V, Bokla L, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 1985; **42**: 791-798.
- 6.-Gay N J, Keith F J. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature* 1992; **351**: 355-356.
- 7.-Hoffmann J A, Kafatos F C, Janeway C A Jr., Ezekowitz A B. Phylogenetic perspective in the innate immunity. *Science* 1999; **284**: 1313-1317.
- 8.-Takeda K, Akira S. Toll-like receptor in innate immunity. *Intern Immun* 2005; **17**: 1-14.
- 9.-Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J M, Hoffmann J A. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; **86**: 973-983.
- 10.-Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signal activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; **388**: 323-324.

- 11.-Medzhitov R H, Janeway C A. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptative immunity. *Nature*1997; **388**: 394-397.
- 12.-Matzinger P. The Danger Model: A Renewed Sense of Self. *Science* 2002; **296**: 01-305.
- 13.-Araújo A, Jansen A M, Bouchet F, *et al.* Parasitism, the Diversity of Life, and Paleoparasitology. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; **98**: 5-11.
- 14.-Beck G, Habicht G S. Immunity and the invertebrates. *Scientific American*1996; **61**: 42-46.
- 15.-Metzhitov R, Janeway C A Jr. Innate Immunity. *New Engl J Med* 2000; **343**: 338-344.
- 16.-Aderem A, Ulevitch R J. Toll-like receptor in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000; **406**: 782-787.
- 17.-Janeway J. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* 1992; **13**: 6-11.
- 18.- Introducción a la inmunología. En: Abbas A K, Lichtman A H., Pober J S, eds. *Inmunología celular y molecular*. McGraw-Hill Interamericana, 2002: 3-17.
- 19.-Células y tejidos del sistema inmunitario. En: Abbas A K, Lichtman A H., Pober J S, eds. *Inmunología celular y molecular*. McGraw-Hill Interamericana, 2002: 17-41.
- 20.-Innate Immunity. En: Roitt I. M, Delves P J, eds. *Essential immunology*. Blackwell science. 2001: 1-19.

- 21.-Especific acquired immunity. En: Roitt I. M, Delves P J. eds. *Essential immunology*. Blackwell science. 2001: 21-35.
- 22.-Immunity the front line of host defense. En: Janeway CA. Jr., Travers. P., Walport. M., Serlommchik. M. eds. *Immunobiology*. Garland Science. 2005: 37-48.
- 23.-The components of the immune system. En: Janeway CA. Jr., Travers. P., Walport. M., Serlommchik. M. eds. *Immunobiology*. Garland Science. 2005: 12-22.
- 24.-Fearon D. Seeking wisdom in innate immunity. *Nat Immunol* 1997; **388**: 323-324.
- 25.-Shi F D, Ljunggren H G, Sarvetnick N. Innate immunity and autoimmunity: from self-protection to self-destruction. *Trends Immunol* 2001; **22**: 97-101.
- 26.-Beutler B. The Toll-Like Receptors as the Primary Sensors of the Innate Immune System. *The Immunologist* 2000; **8**: 124-131.
- 27.-Introduction to the immune system. En: Roitt I V, Brostoff J. Male D. eds. *Immunology*. Mosby, 2001: 1-12. 15-42.
- 28-. Cells, tissues and organs of the immune system. En: : Roitt I V, Brostoff J, Male D. eds. *Immunology*. Mosby, 2001: 15-42.
- 29.-Janssen S, Beyaert R. Role of Toll-like Receptors in Pathogen Recognition. *Clin Microbiol Rev* 2003; **16**: 637-646.
- 30.-Rosemberg C M, Finlay B B. Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. *Nature Reviews* 2003; **4**: 385-395.
- 31.-Takeda K, Akira S. Role of Toll-like receptor in innate immune responses. *Genes to cells* 2001; **6**: 733-742.

32.-Tauszinsg S, Jouonguy E, Hoffmann J A, Imler J L. Toll-related receptor and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 10520-10525.

33.-Lemaitre B, Kromer-Metzger E, Michaut L, *et al*. A recessive mutation, immune deficiency (imd), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 9465-9469.

34.-Akira S. Toll-like receptor signaling. *The J of Biol Chem* 2003; **278**:38105-38108.

35.-Anderson K V. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 2000; **12**:13-19.

36.-Ghos S, May M J, Kopp E B. NF- $\kappa$ -B AND REL PROTEINS: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. *Science* 1998; **16**: 225-260.

37.-Lemaitre B, Reichhart J M, Hoffmann J A. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA*.1997; **94**: 14614-14619.

38.-Irving P, Troxler L, Hever T S, Belvin M, Kopazynski C, Reichhart J M, *et al*. A genom-wide analysis of immune response in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 15119-15124.

39.-Dushay M S, Asling B, Hultmark D. Origin of immunity: Relish, a compound Rel-like gene in the antibacterial defense of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci* 1996; **93**: 10343-10347.

40.-Rock F L, Hardiman G, Timas J C, *et al.* A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 588-593.

41.-Du X, Poltorak A, Wei Y, Beutler B. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur Cytokine Netw* 2002; **11**: 362-371.

42.-Zhang D, Zhang G, Hayden M S, *et al.* A Toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004; **303**: 1522-1526.

43.-Poltorak A, He X, Smirnova I, *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57Bl/10ScCr mice: mutation in *Tlr4* gene. *Science* 1998; **282**: 2085-2088.

44.-Aderem A, Ulevitch R J. Toll-like receptor in the induction of the innate immune response. *Annu Rev Immunol* 2000; **17**: 593-623.

45.-Blander J M, Medzhitov, R. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science* 2004; **304**: 1014-1018.

46.-[www.icampus.ucl.ac.be/.../TRLsignaling.html](http://www.icampus.ucl.ac.be/.../TRLsignaling.html)

47.-Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, *et al.* Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002; **168**: 4531-4537.

48.-[www.inet.uni2.dk/~iirrh/IIR/09inn/TLRSig.htm](http://www.inet.uni2.dk/~iirrh/IIR/09inn/TLRSig.htm)

49.-Metzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001; **1**: 135-145.

50.-Rehli M. Of mice and men: species variation of Toll-like receptor expression. *Trends Immunol* 2002; **23**: 375-378.

51.-Ahmad-Nejad P, Hacker H., Rutz M., Bauer S, Vabulas R M, Wagner H. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* 2002; **32**: 1958-1968.

52.-Heil F, Ahmad-Nejad P, Hemmi H, *et al*. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol* 2003; **33**: 2987-2997.

53.-Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, Oshiumi H, Shangai M, Seto Y, *et al*. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* 2003; **171**: 3154-3162.

54.-Funami K, Matsumoto M, Oshiumi H, Akazawa T, Yamamoto A, Seya T. The cytoplasmic "linker region" in Toll-like receptor 3 controls receptor localization and signaling. *Int Immunol* 2004; **16**: 1143-1154.

55.-Heil F, Hemmi H, Hochrein H M, *et al*. Species-specific recognition of single-stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004; **303**: 1526-1529.

56.-Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, *et al*. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN- $\alpha/\beta$  in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001; **31**: 2154-2156.

57.-Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting Edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus*. *The J of Immunol* 2000; **165**: 5392-5396.

58.-Hacker H, Mischak H, Miethke T, *et al*. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J* 1998; **17**: 6230-6240.

59.-Renshaw M, Rockwell C, Engleman A, Gewirtz J K, Sambhara S. Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. *J Immunol* 2002; **169**: 4697-4701.

60.-Medzhitov R, Janeway C Jr. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trend Micro* 2000; **8**: 452-456.

61.-Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunol* 2001; **8**: 675-680.

62.-Koop E, Medzhitov R. Aplague on Host Defense. *J Exp Med* 2002; **8**: 1009-1012.

63.-Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; **21**: 335-376.

64.-Hirschfeld M, Weis J J, Toshchakov V, Salkowski C A, Cody M J, Ward D C, *et al*. Signalling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect. Immun* 2001; **69**: 1477-1482.

65.-Werst C, Tapping R I, Mathison J C, Chuang T H, Kravchenko V, Saint Girons I, *et al*. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism, *Nat Immunol* 2001; **2**: 346-352.

66.-Smith K D, Andersen-Nissen E, Hayashi F, Strobe K, Bergman M A, Barret S L, *et al*. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol* 2003; **4**: 1247-1253.

- 67.-Netea M G, Van Deuren M, Kullberg B J, Cavaillon J M, Van Der Maer W M. Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors? *Trends Immunol* 2002; **23**: 135-139.
- 68.-Takeuchi O, Kawai T, Muhlredt P F, Radolf J D, Zychlinsky A, Takeda K, *et al*. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 2001; **13**: 933-940.
- 69.-Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda H, Dong Z, *et al*. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 2002; **169**: 10-14.
- 70.-Spitzer J H, Visintin A, Mazzoni A, Kennedy M N, Segal D M. Toll-like receptor 1 inhibits Toll-like receptor 4 signaling in endothelial Cells. *Eur J Immunol* 2002; **32**: 1182-1187.
- 71.-Hayashi F, Smith K D, Ozinsky A, Hawn T R, Yi E C, Goodlett D R, *et al*. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001; **410**: 1099-1103.
- 72.-Ozinsky A, Underhill D M, Fontenot J D, *et al*. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 13766-13771.
- 73.-Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Copeland N G, Gilbert D J, Jenkins N A, *et al*. TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene* 1999; **231**: 59-65.
- 74.-Takeuchi O, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin R L, *et al*. Role of TLRI in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 2002; **169**: 10-14.

75.-Underhill D M, Ozinsky A, Hajjar A M, *et al.* The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 1999; **401**: 811-815.

76.-Alexopoulou L, Thomas V, Schnare M, *et al.* Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1-and TLR2-deficient mice. *Nat Medicine* 2002; **8**: 878-884.

77.-Gantner B N, Simmons R M, Canavera S J, Akira S, Underhill D M. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* 2003; **197**: 1107-1117.

78.-Alexopoulou L, Holt A C, Medzhitov R, Flavell R A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; **413**: 732-738.

79.-Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, *et al.* Differential expression and regulation of Toll-like receptor (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 2000; **164**: 5998-6004.

80.-Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, *et al.* Cutting Edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the *Lps* hene product. *J Immunol* 1999; **162**: 3749-3742.

81.-Lien E, Means T K, Heine H, Yoshimura A, Kusumoto S, Fukase K, *et al.* Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 2000; **105**:497-504.

82.-Poltorak A P, Ricciardi-Castagnoli S C, Beutler B. Physical contact between lipopolysaccharide and Toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**:2163-2167.

83.-Bauer S, Normark S, Richter-Dahlfors. TLR4-dependent lipopolysaccharide signaling in epithelial cells is independent of extracellular protease activity. *Cell Microbiol* 2002; **4**: 297-303.

84.-Byrd-Leifer C A, Block E F, Takeda K, Akira S, Ding A. The role of MyD88 and TLR4 in the LPS-mimetic activity of Taxol. *Eur J Immunol* 2001; **31**: 2448-2457.

85.-Kawasaki K, Akashi S, Shimazu R, Yoshida T, Miyake K, Nishijima M. Mouse Toll-like receptor 4-MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J Biol Chem* 2000; **275**: 2251-2254.

86.-Ulevitch R J, Tobias P S. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol* 1995; **13**: 437-457.

87.-Shimazu R, Akashi S, Ogata H, *et al*. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *Exp Med* 1999; **189**: 1777-1782.

88.-Schromm A B, Lien E, Henneke P, *et al*. Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin induced signaling. *J Exp Med* 2001; **194**: 79-88.

89.-Hayashi F, Smith K D, Ozinsky A, Hawn T R, Goodlett D R, Eng J K. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor-5. *Nature* 2001; **410**: 1099-1103.

90.-Gewirtz A T, Navas T A, Lyons S, Godowski P J, Madara J L. Cutting edge: Bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* 2001; **167**: 1882-1885.

91.-Maaser C, Heidemann J, Von Eife C, Lugering A, Spahan T W, Binion D G, *et al.* Human intestinal microvascular endothelial cells express Toll-like receptor 5: a binding partner for bacterial flagellin. *J Immunol* 2004; **172**: 5056-5062.

92.-Hawn T R, Verbon A, Lettinga K D, *et al.* A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellid signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J Exp Med* 2003; **198**: 2487-2489.

93.-Hemmi H, Kaisho T, Takeda K, Akira S. The roles of Toll-like receptor 9, MyD88 and DNA-PKcs in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *J Immunol* 2003; **170**: 3059-3064.

94.-Visintin A, Mazzoni A, Spitzer J H, Wylie D H, Dower S K, Segal D M. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 2001; **166**: 249-255.

95.-Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2003; **198**: 513-520.

96.-Krug A, French A R, Barcher W, *et al.* TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* 2004; **21**: 107-119.

97.-Tabeta K, Georgel P, Janssen E, *et al.* Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 3516-3521.

98.-Leifer C A, Kennedy M N, Mazzoni A., Lee C, Kruhlak M J, Segal D M. TLR9 Is localized in the Endoplasmic Reticulum Prior to Stimulation. *The J Of Immunol* 2004; **173**: 1179-1183.

99.-Bauer S, Kirschning C J, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, *et al.* Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 9237-9242.

100.-Matzinger P. An Innate Sense of Danger. *Ann NY Acad Sci* 2002; **961**: 341-342.

101.-Galluci S, Matzinger P. Danger Theory: The link between AIS and IDS?. *Opinions. In Immunology* 2001; **13**: 114-119.

102.-Seung-Yong S, Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nature rev Immunol* 2004; **4**: 469-478.

103.-Medzhitov R, Janeway C A. Self-defense: The fruit fly style. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 429-430.

104.-Muzio M, Ni J, Feng P, Dixit VM. IRAK (Pelle) Family Member IRAK-2 and MyD88 as Proximal Mediators of IL-1 signaling. *Science* 1997; **278**: 1612-1615.

105.-Muzio M, Natoli G, Saccani S, *et al.* The Human Toll signaling Pathway: Divergence of Nuclear Factor  $\kappa$ B and JNK/SAPK Activation Upstream of Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 6 ( TRAF6). *J Exp Med* 1998; **187**: 2097-2101.

106.-Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88 -deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999; **11**: 115-122.

107.-Hacker H, Vabulas R M, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Wagner H. Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF6). *J Exp Med* 2000; **192**:595-600.

108.-Schnare M, Holt A C, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88. *Curr Biol* 2000; **10**: 1139-1142.

109.-Hornig T, Barton G M, Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2001; **2**:835-841.

110.-Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Mühlradt P F, Sato S, Hoshino K, Akira S. Lipopolysaccharide stimulated the MyD88-Independent pathway and results in activation of IRF-3 and the expression of a subset of LPS-inducible genes. *J Immunol* 2001; **167**: 5887-5894.

111.-Yoneyama M, Suhara W, Fukuhara Y, Fukuda M, Nishida E, Fujita T. Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO J* 1998; **17**: 1087-1095.

112.-Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, *et al.* Essential role of TIRAP/Mal for activation of the signaling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 2002; **420**: 324-329.

113.-Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa, T, Seya T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon- $\beta$  induction. *Nat Immunol* 2003. **4**: 161-167.

114.-Fitzgerald K A, Rowe D C, Barnes B J, *et al.* LPS-TLR4 signalling to IRF-3/7 and NF- $\kappa$ B involves the Toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 2003; **198**: 1043-1055.

- 115.-Yamamoto M. Sato S. Hemmi H. *et al.* Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003; **301**: 640-643.
- 116.-Bin L. H. Xu L. G. Shu H. B. TIRP, a novel Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adapter protein involves in TIR signaling. *J Biol Chem* 2003; **278**: 24526-24532.
- 117.-Yamamoto M. Sato S. Hemmi H. Uematsu S. Hoshino K. TRAM is specifically involved in the TLR-4 mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 2003; **4**: 1144-1150.
- 118.-[www.biken.osaka-u.ac.jp/act/images/akiraB.png](http://www.biken.osaka-u.ac.jp/act/images/akiraB.png)
- 119.-Beeson P. B. Tolerance to bacterial pyrogens: I. Factors influencing its development. *J Exp Med* 1947; **86**: 29-38.
- 120.-Noruma F. Akashi S. Sakao Y. Sato S. Cutting Edge: Endotoxin Tolerance in Mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface Toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 2000; **164**: 3476-3479.
- 121.-Akashi S. Shimazu R. Ogata H. Nagai Y. Takeda K. Kimoto M. *et al.* Cutting edge: Cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the Toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 2000; **164**: 3471-3475.
- 122.-Li L. Cousart S. Hu J. McCall C. E. Characterization of interleukin-1 receptor-associated kinase in normal and endotoxin-tolerant cells. *J Biol Chem* 2000; **275**: 23340-23345.
- 123.-Sato S. Takeuchi O. Fujita T. Tomizawa H. Takeda K. Akira S. A variety of microbial components induce tolerance to lipopolysaccharide by differentially affecting MyD88-dependent and-independent pathways. *Int Immunol* 2002; **14**: 783-791.

124.-Kobayashi K, Hernandez I. D, Galan J E, Janeway C A Jr., Metzhitov R, Flavell R A. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 2002; **110**: 191-202.

125.-Wesche H, Gao X, Li X, Kirschning C J, Stark G R, Cao Z. IRAK-M is a novel member of the Pelle/interlukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family. *J Biol Chem* 1999; **274**: 19403-19410.

126.-Alipantris A O, Yang M R, Mark S, Suggett B, Devaux J D, Radolf G R, *et al*. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 1999; **285**: 736-739.

127.-Alipantris A O, Yang R B, *et al*. The apoptotic signaling pathway mechanism in innate immunity. *Acta Odontol Scand* 2000; **3**: 3325-3336.

128.-Belvin M P, Anderson K V. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996; **12**: 393-416.

129.-O'Neill L A, Greene C. Signal transduction pathway activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol* 1998; **63**: 650-657.

130.-Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa] B activity. *Annu Rev Immunol* 2000; **18**: 621-663.

131.-Brogdem K A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacterias. *Nature* 2005; **3**: 238-250.

132.-Lehrer R I, Harwig S, Ganz T. Defensins and protegrins: Vertebrate analogues of arthropod antimicrobial peptides. In: Hoffmann J A, Janeway C A, Natori S, eds.

*Phylogenetic perspective in Immunity: The Insect Host Defense*. R.G Landes Company, 1994: 19-29.

133.-Keiser V, Diamond G. Expression of mammalian defensin genes. *J Leukoc Biol* 2000; **68**: 779-784.

134.-Diamond G, Russell J P, Bevins C L. Inducible expression of an antibiotic peptide gene in lipopolysaccharide-challenged tracheal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 5156-5160.

135.-Becker M, Diamond G, Verghese M, Randell S H. CD14-dependent LPS-induced  $\beta$ -defensin expression in human tracheobronchial epithelium. *J Biol Chem* 2000; **275**: 29731-29736.

136.-Shing P K, Jia H P, EWiles K, *et al*. Production of  $\beta$ -defensin by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 14961.

137.-Mathews M, Jia H P, Guthmiller J M. Production of  $\beta$ -defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. *Infect Immun* 1999; **67**: 2740-2745.

138.-Liu A Y, Destoumieux D, Wong A V, Park C H, Valore E V, Liu L, Ganz T. Human  $\beta$ -defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, and the state of differentiation. *J Invest Dermatol* 2002; **118**: 275-281.

139.-Harder J U, Meyer-Hoffert L M, Teran L, *et al*. Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa*, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ , bt not IL-6, induce human  $\beta$ -defensin-2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; **22**: 714-721.

140.-Liu L, Roberts A A, Ganz T. By IL-1 signaling, monocyte-derived cells dramatically enhance the epidermal antimicrobial response to lipopolysaccharide. *J Immunol* 2003; **170**: 575-580.

141.-Krisanaprakornkit S, Kimball J R, Weinberg A, Darveau R P, Bainbridge B W, Dale B A. Inducible expression of human  $\beta$ -defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathway and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infect Immun* 2000; **68**: 2907-2915.

142.-Niitschke M, Wiehl S, Baer P C, Kreft B. Bactericidal activity of renal tubular cells: the putative role of human  $\beta$ -defensins. *Exp Nephrol* 2002; **10**:332-337.

143.-O'Neil DA, Porter E M, Elewaut D. Expression and regulation of the human  $\beta$ -defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol* 1999; **163**: 6718-6724.

144.-Birchler T, Seibl R, Buchner K, *et al*. Human Toll-like receptor 2 mediates induction of the antimicrobial peptide human  $\beta$ -defensin-2 in response to bacterial lipoprotein. *Eur J Immunol* 2001; **31**:3131-3137.

145.-Phoebe T, Serge O, Ferrandon D C, Jean M R, Lemaitre B, *et al*. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity* 2000; **13**: 737-748.

146.-Chalifoor A, Jeannin P, Gauchat J F, *et al*. Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood* 2004; **104**: 1778-1783.

- 147.-Goldstein D R, Tesar B M, Akira S, Lakkis F G. Critical role of the Toll-like receptor signal adaptor protein MyD88 in acute allograft rejection. *J Clin Invest* 2003; **111**: 1571-1578.
- 148.-Michelsen K S, Michelle H W, Prediman K S, *et al*. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduce atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**:10679-10684.
- 149.-Rakkof-Nahoun S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004; **118**: 229-241.
- 150.-Arbaour N C, Lorenz B E, Schutte C J, *et al*. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in human. *Nat Genet* 2000; **25**: 187-191.
- 151.-Hajjar A M, Ernst R K, Tsai J H, Wilson C B, Miller S I. Human Toll-like receptor 4 recognizes host specific LPS modifications. *Nature Immunol* 2002; **3**: 354-359.
- 152.-Pierre-Y B, Thierry C. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatments. *Clinical review* 2003; **326**: 262-266.
- 153.-Child N J, Yang I A, Pulletz MCK, *et al*. Polymorphisms in Toll-like receptor 4 and the systemic inflammatory response syndrome. *Biochem Soc Trans* 2003; **31**: 652-653.
- 154.-Ogus A C, Yoldas B, Ozdemir T, *et al*. The Arg753Gln polymorphism of the human Toll-like receptor 2 gene in tuberculosis diseases. *Eur Respir J* 2004; **23**: 219-223.

155.-Bochud P Y, Hawn T R, Aderem A. Cutting edge: a Toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous in unable to mediate mycobacterial signaling. *J Immunol* 2003; **170**: 3451-3454.

156.-Kang T J, Chae G T. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001; **31**: 53-58.

157.-Ben-ali M, Barbouche M R, Bousnina S, Chabbou A, Dellagi K. Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; **11**: 625-626.

158.-Escoll P, del Fresno C, Garcia L, Valles G, *et al*. Rapid up-regulation of IRAK-M expression following a second endotoxin challenge in human monocytes and in monocytes isolated from septic patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **311**: 465-472.

159.-Smahi A, Courtois G, Vabres P, *et al*. Genomic rearrangement in NEMO impairs NF- $\kappa$ B activation and is a cause of incontinentia pigmenti. The international Incontinentia Pigmenti (IP) Consortium. *Nature* 2000; **405**: 466-472.

160.-Cook D N, Pisetsky D S, Schwartz D A. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nature Immunology* 2004; **10**: 975-979.

161.-Transtornos de la inmunidad. En: Ramzi, S, C., Virey K., Tucker C, eds. *Patología estructural y funcional*. McGraw-Hill Interamericana, 1999: 211-276.

162.-Krechi S, *et al*. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med* 2002; **347**:185-192.

163.-Ameziane N, Beillat T, Verpillat P, *et al.* Association of the Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with acute coronary events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; **23**: 61-64.