



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

## “DETECCION Y LOCALIZACION DE TLR 2, 3, 4 Y 9 EN PLACENTA, EN EMBARAZOS A TERMINO DE PACIENTES NORMALES Y CON PREECLAMPSIA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

M A E S T R I A E N :

BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION

P R E S E N T A :

M.C. ANTONIO PINEDA CARRANZA

TUTORA: DRA. LETICIA MORENO FIERROS

IZTACALA, EDO. MEX.

ENERO DE 2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

Ha quien debo agradecer por haberme dado la oportunidad de vivir así como de haberme permitido conocer a toda la gente linda que me apoyo en este difícil quehacer de hacer ciencia. Que siempre escuchó mis plegarias y me brindo una oportunidad más en la vida, a él es el primero en darle las gracias... gracias amigo Jesús.

Un agradecimiento especial merece aquel amigo al que alguna vez me dijo que sin miedo las cosas siempre salen bien, que con sus consejos desde niño logre ser quien soy, y aunque ahora ya no esté conmigo le he de agradecer por toda la eternidad. Gracias padre mío.

Agradezco a mi familia por que fueron quienes me apoyaron durante mi formación profesional y forjaron en mí el instinto de superación y de triunfo en cada proyecto emprendido. Gracias mama y a mis tres queridos hermanos.

Un infinito agradecimiento a mi esposa Gina, a mis hijos Ale, Ingrid y Jorge, que con su comprensión, apoyo, consejos y chispas de alegría, pude salvar cada obstáculo que se me presento y porque sin ellos no hubiera sido posible finalizar este proyecto profesional del cual todos somos partícipes.

A la DRA. LETICIA MORENO FIERROS, que nunca me cerró las puertas de su sabiduría y de su tan noble corazón, porque siempre me tendió la mano a pesar de lo difícil que fueran las cosas y me apoyo hasta el último momento. Gracias y que Dios la bendiga Dra. Moreno.

Si hay alguien a quien debo agradecer de manera muy especial su apoyo incondicional y siempre acertado, porque con sus ideas y consejos logre llegar a mi objetivo final, además de su invaluable amistad. Gracias amiga, M en C. SILVIA LETICIA VERDIN TERAN.

Gracias a los honorables miembros del jurado; DRA. EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE, DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN, DRA LETICIA MORENO FIERROS, DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO Y AL DR. MARTIN PALOMAR MORALES, porque con sus discernimientos y su saber de buena tinta enriquecieron este trabajo.

A los que se involucraron en este trabajo; Dr. Ausencio Camacho Romero, patólogo y amigo, por su apoyo, al Dr. Miguel de Jesús Cabrera Martínez, patólogo y amigo, porque con sus aciertos pude concluir este trabajo. Gracias.

A mis compañeros del laboratorio que pusieron su granito de arena en este trabajo para lograra mi objetivo. Dr. Marco y Dra. Rebeca. Gracias.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 9 Inmunidad en Mucosas, UBIMED FES Iztacala UNAM, con la tutoría de la Dra. Leticia Moreno Fierros, y apoyado parcialmente por PAPIIT, CONACYT y PAPCA.

<b>INDICE</b>	<b>Pág.</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	2
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	3
<b>RESUMEN</b> .....	4
<b>SUMMARY</b> .....	5
<b>INTRODUCCION</b> .....	6
<b>RECEPTORES TIPO TOLL (TLR)</b> .....	7-8
<b>LOCALIZACION DE LOS TLRs</b> .....	8
<b>MECANISMOS DE ACTIVACION DE LOS TLRs</b> .....	8-9
<b>PRINCIPALES LIGANDOS DE LOS TLRs</b>	
TLR1, TLR2 Y TLR6 .....	9-10
TLR3 .....	10
TLR4 .....	10-11
TLR5 .....	11
TLR7 Y TLR8 .....	12
TLR9 .....	12
TLR10 .....	12
TLR11 .....	13
<b>CUADRO DE EXPRESION DE LOS TLRs</b> .....	14
<b>ANTECEDENTES</b>	
EMBARAZO Y TLRs .....	15-16
SEÑALES DE LOS TLRs EN CELULAS DEL TROFOBLASTO .....	16
APOPTOSIS Y TLRs EN CELULAS DEL TROFOBLASTO .....	16-17
INFECCION, TLRs Y COMPLICACIONES EN EL EMBARAZO .....	17-18
TLRs E INMUNOLOGIA DEL PARTO PRETERMINO Y DE TÉRMINO .....	18-19
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	20-21
<b>JUSTIFICACION</b> .....	22
<b>HIPOTESIS</b> .....	22
<b>OBJETIVOS</b> .....	22
<b>MATERIAL Y METODOS</b> .....	23-24
<b>RESULTADOS</b> .....	25-31
<b>DISCUSIÓN</b> .....	32-35
<b>CONCLUSIONES</b> .....	26
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	36
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	37-43

## INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Estructura de las vellosidades corionicas. ....	27
Fig. 2. Placentas con la técnica de h-e. ....	27
Fig. 3. Expresión de TLR2 en placenta control y con preeclampsia....	28
Fig. 4. Expresión de TLR4 en placenta control y con preeclampsia....	28
Fig. 5. Colocalización de los receptores TLR2 y TLR4, en placentas control y con preeclampsia. ....	29
Fig. 6. Expresión de TLR3 en placenta control y con preeclampsia...	29
Fig. 7. Expresión de TLR9 en placenta control y con preeclampsia...	30
Fig. 8. Colocalización de los receptores TLR3 y TLR9, en placentas control y con preeclampsia. ....	30
Fig.9. Diferencias en la expresión de los TLRs en placentas control y con preeclampsia. ....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>CpG</b>	<b>Dinucleótidos C-G no metilados.</b>
<b>DD</b>	<b>Dominio de muerte.</b>
<b>DNA</b>	<b>Acido Desoxidoribonucleico.</b>
<b>FADD</b>	<b>Dominio de muerte asociado al Fas.</b>
<b>FITC</b>	<b>Isotiocinato de fluoresceína.</b>
<b>HSP60</b>	<b>Proteína de choque térmico 60.</b>
<b>HSP70</b>	<b>Proteína de choque térmico 70.</b>
<b>IL</b>	<b>Ínterleucina.</b>
<b>INF-<math>\alpha</math></b>	<b>Interferón alfa.</b>
<b>LBP</b>	<b>Proteína transportadora de LPS.</b>
<b>LPS</b>	<b>Lipopolisacaridos.</b>
<b>LRR</b>	<b>Repeticiones ricas en leucinas.</b>
<b>MyD88</b>	<b>Factor de Diferenciación Mieloide 88.</b>
<b>NF-kB</b>	<b>Factor Nuclear kappa B.</b>
<b>PAMPs</b>	<b>Patrón molecular asociado a patógenos.</b>
<b>PBS</b>	<b>Amortiguador de fosfatos en solución salina.</b>
<b>PE</b>	<b>Ficoeritrina.</b>
<b>PGDH</b>	<b>15-hidroxiprostaglandina deshidrogenasa.</b>
<b>PRRs</b>	<b>Receptores de reconocimiento de patrón molecular asociado a patógenos.</b>
<b>RNA</b>	<b>Acido ribonucleico.</b>
<b>RNAs</b>	<b>Doble cadena de RNA.</b>
<b>TICAM</b>	<b>Molécula adaptadora del dominio TIR.</b>
<b>TIRAP</b>	<b>Proteína adaptadora que contiene el dominio TIR.</b>
<b>TIR</b>	<b>Receptor Toll/IL-1.</b>
<b>TLR</b>	<b>Receptor tipo Toll.</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>Factor de necrosis tumoral alfa.</b>
<b>TRIF</b>	<b>Adaptador que contiene un dominio TIR inductor de IFN-B.</b>
<b>UBIMED</b>	<b>Unidad de biomedicina.</b>
<b>VIH</b>	<b>Virus de inmunodeficiencia humana.</b>

## RESUMEN

Introducción: Los receptores tipo Toll (Toll Like Receptors TLR) median la respuesta inmune innata. Los TLR2, 3 y 4 han sido estudiados en placenta humana, aunque su expresión y distribución no ha sido claramente establecida, mientras que el TLR 9 no se ha estudiado en placenta.

Antecedentes: Se ha detectado por inmunohistoquímica la localización de TLR2 y TLR4 en placentas a término de pacientes normales y estimuladas con zimosan y lipopolisacaridos. Algunos autores no detectan expresión de TLR4 en placentas normales a término, pero sí en corioamnionitis. Otros autores detectan TLR4 en placentas a término de pacientes normales, preeclampsia y corioamnionitis, con mayor expresión en preeclampsia. Hipotesis: En pacientes con preeclampsia hay aumento en la respuesta inflamatoria en la interfase materno-fetal, por lo que planteamos que la expresión de los TLR 2, 3, 4 y 9 en las placentas estará incrementada. Metodología: se obtuvieron muestras de placentas de pacientes con embarazos normales y con preeclampsia, se fijaron en sales de zinc, se procesaron y se analizaron por inmunofluorescencia con microscopia confocal. Resultados: Se observó que el TLR2 y el TLR4 se expresan en el trofoblasto y el endotelio vascular del estroma veloso de placentas normales y con preeclampsia, aumentando su expresión en preeclampsia. El TLR3 y el TLR9 se expresan en el trofoblasto de placentas normales y con preeclampsia, aumentando en las placentas con preeclampsia. En el estroma, la expresión de TLR2 y 9 predominó en endotelio vascular. Se observó co-localización de TLR 2 y 4 así como de TLR 3 y 9 en el trofoblasto. Conclusión: La expresión de TLR 2, 3, 4 y 9 se incrementa en las placentas con preeclampsia, aunque se requieren más estudios para determinar el papel de los TLRs en la inmunología del embarazo y establecer su relación con la preeclampsia.

## SUMMARY

Introduction: Toll-like Receptors (TLR) mediate the innate immune response. TLR2, 3 and 4 have been studied in human placenta, although its expression and distribution have not been clearly established, whereas TLR 9 has not been studied in placenta.

In placentas from normal term pregnancies the localization of TLR2 and TLR4 has been detected by immunohistochemistry and after stimulation with zymosan or lipopolysaccharide in placenta cultures. Some authors have not detected TLR4 expression in placentas from normal term pregnancies but they found it in placentas with chorioamnionitis. While other authors detected TLR4 in placentas from normal pregnancies, preeclampsia and chorioamnionitis patients, with greater expression in preeclampsia. Hypothesis: In patients with preeclampsia there is increase in the inflammatory response in the materno-fetal interphase, reason why we supposed that the expression of TLR 2, 3, 4 and 9 will be increased in placentas from patients with preeclampsia. Methodology: Samples of placentas from patients with normal term pregnancies and from patients with preeclampsia, were obtained. They were fixed with zinc salts, processed and analyzed by immunofluorescence with confocal microscopy. Results: It was observed that the TLR2 and the TLR4 are expressed in the trophoblast and endotelio vascular of estroma veloso of normal placentas and with preeclampsia, increasing its expression in preeclampsia. The TLR3 and the TLR9 are expressed in the trophoblast of normal placentas and from preeclampsia patients. Although increased reaction was detected in the placentas with preeclampsia. In the estroma, the expression of TLR2 and 9 predominated in vascular endothelium. Co-localization of TLR 2 and 4 as well as of TLR 3 and 9 in the trophoblast was observed. Conclusion: The expression of TLR 2, 3, 4 and 9 is increased in the placentas with preeclampsia, although more studies are required to determine the role of TLRs in pregnancy immunology and to establish their relation with preeclampsia.

## 1. INTRODUCCION

El sistema inmune es el conjunto de tejidos, células y moléculas responsables de la inmunidad, y su respuesta colectiva y coordinada frente a la introducción en el organismo de sustancias extrañas así como de organismos invasores, se denomina respuesta inmune.

La primera respuesta de defensa a los patógenos depende del sistema inmune, que en mamíferos se divide en innato y adaptativo. Ambos tienen la capacidad de diferenciar entre las células propias y los posibles invasores. El sistema inmune adaptativo es altamente sofisticado, está mediado por células T y B que responden a antígenos específicos con la producción de anticuerpos y se encuentra solo en vertebrados. Se denomina adaptativo porque durante el curso de una infección se ajusta la respuesta en función del tipo de agente, para optimizar la acción defensiva, respondiendo ante sustancias específicas que generan su producción. Otra característica importante es que dota de memoria al sistema inmunitario.

Ambos sistemas inmunes; el innato y el adaptativo, dependen de las células blancas o leucocitos; el innato está mediado por los granulocitos y macrófagos, y el adaptativo por la acción de los linfocitos. Ahora se sabe que sin una respuesta inmune innata no hay respuesta adaptativa.

La respuesta inmune innata no es exclusiva de los humanos, se trata de un sistema ancestral, puesto que disponen de ella casi todos los organismos estudiados. Muchos utilizan los receptores de membrana del tipo Toll-like (TLR) como desencadenantes, que también se encuentran en plantas. El primer receptor tipo Toll debió surgir en un organismo unicelular, antepasado común de animales y plantas, y puede incluso que estas moléculas facilitaran nuestra evolución; ya que sin un sistema de defensa eficaz contra las infecciones, quizá los organismos multicelulares jamás hubieran sobrevivido (Janeway 2002).

## 2. RECEPTORES TIPO TOLL (TLR)

La respuesta inmune innata está mediada fundamentalmente por macrófagos, neutrófilos y células dendríticas. Estas células reconocen al agente patógeno a través de sus receptores, lo fagocitan, lo destruyen y sintetizan mediadores de la inflamación y citocinas. El tipo de estos receptores más importantes recientemente descritos es una familia de proteínas transmembrana tipo I, caracterizados porque la porción C-Terminal es intracelular y la porción N-Terminal es extracelular con un solo dominio transmembranal. Estos receptores han sido denominados “Toll Like Receptores” (TLR). *Toll* es una palabra inglesa que puede traducirse como “peaje”.

Los TLRs fueron descubiertos inicialmente en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), en donde es fundamental para el desarrollo embrionario; ya que permite mantener la polaridad dorso-ventral (Hashimoto y col 1988). Estudios posteriores revelaron que el gen Toll también tiene propiedades antibacterianas y anti-micóticas en la mosca adulta, por lo que moscas con mutaciones en algunos genes de la vía Toll son sumamente susceptibles a la infección por hongos y ciertas bacterias (Lamaitre y col 1996). Poco después, en los mamíferos se identificaron genes homólogos a TLR (Rock y col 1998). Estos receptores transmembranales en su dominio extracelular contienen repeticiones ricas en leucina (LRR), que juegan un importante papel en la especificidad de la respuesta a las infecciones. El dominio intracitoplásmico del receptor Toll y del receptor de IL-1 en mamíferos es muy parecido por lo que se habla del dominio “Toll/IL-1 Receptor” (TIR) (Chaudhary y col 1998). Los TLR son los responsables del reconocimiento de varios tipos de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs del inglés *pathogen-associated molecular patterns*), porque los receptores tipo Toll son receptores de reconocimiento de patrón (PRRs del inglés *Pattern-recognition receptors*), que inducen la expresión de genes que intervienen en la respuesta inmune (Gordon 2002).

La familia de los TLR se compone de 11 miembros, la secuencia de aminoácidos y la estructura química permite su clasificación (TLR 1-11). El TLR3 es el único miembro codificado por 5 exones, en tanto que los otros se codifican solo por uno o dos. Algunos receptores trabajan en forma cooperativa. El TLR 2 puede formar heterodímeros con TLR1 y TLR6. El TLR1/TLR6 es necesario para reconocer peptidoglicanos, mientras que el TLR2 por sí mismo puede reconocer lipopéptidos bacterianos.

## 2.1 LOCALIZACION DE LOS TLRs

Los TLRs tienen diferente distribución dentro de la célula. Se ha demostrado por tinciones positivas de la superficie celular con anticuerpos específicos que los TLR1, TLR2, TLR4 y TLR6 se expresan en la superficie celular mientras que los TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 presentan una expresión intracelular en los endosomas. Para el reconocimiento de sus ligandos por los TLR3, TLR7 o TLR9 se requiere de maduración endosómica (Takeda y Akira, 2005).

## 2.2 MECANISMOS DE ACTIVACION DE LOS TLRs

Aunque algunos trabajos sugieren que el TLR2 y TLR4 tienen una clara especificidad para diferentes ligandos microbianos, actualmente el mecanismo de activación de los TLRs es confuso. Una proteína que puede jugar un importante papel en la función de los TLRs es la CD14. La CD14 es la primera proteína que se identificó como receptor de los lipopolisacáridos (LPS). Puede unir moléculas que contienen lípidos, incluyéndolos los LPS, lipoproteínas microbianas de la pared celular del *Streptococcus* y lípidos del *M. tuberculosis* (Wright y col 1990). Sin embargo la CD14 no atraviesa la membrana celular hacia el citoplasma y los LPS solos no pueden mediar eventos de señales, pero pueden requerir un co-receptor para activar la vía de señales intracelulares. La expresión sola de CD14 no confiere sensibilidad a los LPS para las líneas celulares. Cuando el CD14 es co-expresado con TLR2 o TLR4 la activación de NF- $\kappa$ B por LPS, lipoproteínas microbianas o lípidos es incrementada. Estas observaciones son concluyentes con el papel de CD14 en

la activación celular y producción de citocinas. Se ha identificado otra proteína como co-receptor importante involucrado en la respuesta de los TLR, la MD2, la cual muestra una asociación como co-factor con TLR4 en su porción extracelular, aumentando la respuesta a los LPS, además la MD2 es requerida para el funcionamiento de TLR4 (Da silva Correira y col 2001). En humanos se requiere de todo el complejo (TLR4-MD2-CD14) para una correcta activación por los LPS. Estudios recientes sugieren que una interacción directa TLR4-LPS se compara con una sensibilidad especie-específica para diferentes formas de LPS-lípidos. El TLR4 de humanos y ratones es capaz de discriminar entre diferentes formas de LPS, según la especie (Brightbill y Modlin 2000).

## 2.3 PRINCIPALES LIGANDOS DE LOS TLRs

### 2.3.1 TLR1, TLR2 Y TLR6

Las células que expresan TLR2 son los monocitos, las células endoteliales, los neutrófilos, los basófilos y las células dendríticas.

El TLR2 reconoce una gran variedad de componentes de microorganismos, tales como lipoproteínas de bacterias Gram (-), *Mycoplasma* y *Spirochaeta*; péptidoglicano y ácido lipoteicoico de bacterias Gram (+); lípidos de *Mycobacteria*; fosfolípidos de glucoinositol de *T. cruzi*; zimosan de hongos; purinas de la membrana externa de *Neisseria*; glucolípidos de *T. maltophilum*; LPS de *Helicobacter pylori*, y *Porphyromonas gingivalis* (Takeda y col 2003). Muchos LPS identificados por TLR2 no son identificados por TLR4. Se proponen dos aspectos por los cuales los TLR2 pueden reconocer un mayor espectro de componentes microbianos. Primero; los TLR2 forman dímeros heterofílicos con otros TLRs para detectar ligandos e inducir señales. El TLR2 coopera con TLR1 y TLR6, ya que ambos son estructuralmente parecidos a los TLR2. El heterodímero TLR2 /TLR6 reconoce lipopéptidos bacterianos. El TLR2/TLR1 reconoce lipoproteínas. El segundo; involucra reconocimiento de componentes de hongos por los TLR2. En este modelo el TLR2 colabora con

distintos tipos de receptores como la dectina-1, que es un receptor de la familia de las lectinas, y reconoce B-glicanos de la pared celular de los hongos. Así los TLR2 reconocen un amplio rango de productos microbianos por medio de la función cooperadora con diversas proteínas que tienen una estructura similar o no similar (Wetzler 2003).

### **2.3.2 TLR3**

Este receptor tiene una estructura única, pues carece de residuos de prolina que son abundantes en los otros receptores. Se ha localizado en la placenta, el páncreas, el pulmón, el hígado, el corazón y el cerebro (Rock y col 1998). Se expresan en células dendríticas maduras, y en células epiteliales intestinales. Su ligando es el RNA de doble cadena (dsRNA) que se produce durante la replicación viral y es un potente inductor de genes de interferón alfa y beta así como promotor de la actividad de células dendríticas, y de la inducción de citocinas (Bell y col 2005, 2006).

### **2.3.3 TLR4**

Es el primer receptor reconocido en mamíferos y es el más estudiado. Participa en el reconocimiento de LPS, componente esencial de las bacterias Gram (-). Para emitir las señales necesarias en el inicio de la respuesta inmune requiere otras moléculas adicionales; el LPS se une a una proteína de unión presente en el suero, denominada LBP, y forma un complejo que es reconocido por el CD14, una molécula anclada a la membrana por glucosilfosfatidilinositol (GPI) que se expresa preferentemente en monocitos, macrófagos y neutrófilos (Wright y col 1990). El CD14 es un receptor para LPS que se puede encontrar soluble o unido a membranas. Por lo tanto cuando ingresan LPS se produce el acercamiento físico del CD14 y el TLR4 (Jian y col 2000). La MD2 que se encuentra asociada al dominio extracelular del TLR4 aumenta la respuesta de los receptores a los LPS. Aunque la MD2 no tiene un dominio transmembrana permanece asociada a las células por su unión al dominio extracelular de los TLR4 (Shimazu y col 1999). La RP105 es otra proteína de superficie involucrada en el reconocimiento de los LPS. Tiene un dominio extracelular

estructuralmente similar a los TLRs y Se expresa fundamentalmente en células B (Ogata y Miyake 2000).

También se relaciona con el reconocimiento de ligandos endógenos como las proteínas de choque térmico HSP60 y HSP70. Este factor estresante se incrementa durante la exposición a radiaciones ultravioleta, quemaduras, infecciones por bacterias y virus, así como con la inflamación que aparece en la arteriosclerosis. Es uno de los factores que promueven la enfermedad vascular en asociación con infecciones como la inducida por *Chlamidia pneumoniae*. El resultado de la unión entre el ligando HSP60 con el TLR4 activa los macrófagos y las células dendríticas para secretar citocinas proinflamatorias (IL12) y moléculas co-estimuladoras. Lo anterior representaría una señal de alarma y una reacción de tipo TH1 (Gao y Tsan 2003). Como otros ligandos endógenos que activan al receptor; ante un daño tisular, aparecen diversos componentes de la matriz extracelular como fibronectina, ácido hialurónico y sulfato de heparina, que intervienen en la reparación tisular. Se ha demostrado que el dominio A de la fibronectina tiene actividad inmunoestimulante similar a la de los LPS. El antimicótico taxol estimula los TLR4. Otro ligando del TLR4 es la proteína de fusión del virus respiratorio sincicial (Takeda y col 2003).

#### 2.3.4 TLR5

Su ligando natural es la flagelina de los microorganismos Gram (-), proteína que permite el movimiento de los flagelos en el medio acuoso y la fijación a las células del huésped. Se expresa en la parte basal pero no en la apical de las células epiteliales del intestino. También se ha observado que se expresa en las células endoteliales intestinales del compartimiento subepitelial. La flagelina activa las células epiteliales del pulmón induciendo la producción de citocinas inflamatorias. Esto demuestra la importancia que tiene el TLR5 en el reconocimiento de microbios en las superficies mucosas. Además solo reconoce flagelina de microbios patógenos como la *Salmonella*, pero no de comensales como *E. coli* (Hayashi 2001 y Gewirtz y col 2001).

### 2.3.5 TLR7 y TLR8

Estructuralmente son muy semejantes. Reconocen como ligandos algunos compuestos sintéticos. El TLR7 y el TLR8 de humanos reconocen compuestos imidazoquinolinas, pero el TLR8 de ratón no los reconoce (Jurk y col 2002). La loxoribina (Heil 2003), y la bropiridina son inmunomoduladores que activan el sistema inmune cutáneo al ser aplicados sobre la piel. Recientemente se ha descrito que reconocen ácidos nucleicos virales. Reconocen RNA de cadena simple ricas en guanósina o uridina de virus como el VIH, virus de la estomatitis vesicular y el virus de la influenza (Heif 2004; Diebold y col 2004). Las células dendríticas que poseen receptores de TLR7 y TLR9 al ser estimuladas producen grandes cantidades de INF-alfa.

### 2.3.6 TLR9

Este receptor es activado por DNA bacteriano y parasitario que contiene dinucleótidos C-G no metilados (CpG), relativamente poco frecuente en el genoma de los vertebrados. El DNA de bacterias es un importante activador de la respuesta inmune con expresión predominante de IL-12 y TNF-alfa en las células dendríticas, con lo cual se polariza la respuesta inmune a TH1. La unión con el DNA se produce en el endosoma (intracelular) a diferencia de los receptores TLR1, TLR2 y TLR4 que lo hacen en la superficie celular. En los queratinocitos, el TLR9 aumenta la capacidad celular para reaccionar frente al DNA de moléculas patógenas. (Takeda y col 2003; Takeda y Akira 2005) otros estudios demuestran que el TLR9 se localiza en el retículo endoplásmico de células dendríticas y macrófagos (Latz E y col 2004).

### 2.3.7 TLR10

Poco se sabe acerca de este receptor, su gen se encuentra en el cromosoma 4 humano. Se cree que está relacionado con TLR1 y TLR6. Se expresa en células B. Aun se desconocen los ligandos relacionados con este receptor. Puede formar dímeros con TLR2 y probablemente tenga cierta participación en el asma (Takeda y Akira 2005).

### 2.3.8 TLR11

Este receptor se descubrió recientemente en el ratón. Se expresa en células epiteliales de vejiga. No se han identificado sus ligandos, y se ha demostrado que media una respuesta bacteriana anti-uropatogénica en ratón. En humano no es una proteína funcional. Se cree que esta proteína es inútil en el desarrollo humano y que se ha perdido a través de la evolución (Zhang y col 2004).

En el cuadro uno se describen las poblaciones celulares que expresan los diferentes TLRs, su ligando y el origen de sus ligandos.

Cuadro 1. Expresión de los TLR en poblaciones celulares humanas y sus respectivos ligandos.

Receptor	Expresión	Ligandos	Origen del ligando
TLR1	Mon, PMN, LB, NK, CD, LT	Lipopéptidos triacilados	Bacterias y <i>Mycobacterium</i> spp.
TLR2	Mon, PMN, CD, NK	Lipoproteínas y lipopéptidos Peptidoglicano Ácido lipoteicoico Lipoarabidomanán Modulina soluble en fenol Lipopolisacáridos atípicos  Glicoinositolfosfolípidos, glicolípidos Porinas Lipofosfoglicano Zymosan Hemaglutinina y otras proteínas virales	Varios microorganismos  Bacterias Gram positivas <i>Mycobacterium</i> spp. <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Leptospira interrogans</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Trypanosoma</i> spp. <i>Neisseria</i> spp. <i>Leishmania major</i> Hongos Citomegalovirus, virus de la coriomeningitis linfocítica, VHS-1 y VHS-2, VHC, virus del sarampión
TLR3	Mon, CD, LT, NK, epitelios, fibroblastos	ARN de doble cadena (dsARN)	Virus (Reovirus y Flavivirus, entre otros)
TLR4	Mon, PMN, CD, NK, LB, LT, Endotelio	Lipopolisacárido  Proteína de fusión Proteínas de envoltura  HSP60	Bacterias Gram negativas  Virus sincitial respiratorio VHC, virus del tumor mamario de ratón, virus Coxsackie, virus del sarampión <i>Chlamydia pneumoniae</i>
TLR5	Mon, PMN, CD, NK, próstata, hígado, pulmón	Flagelina	<i>Listeria monocytogenes</i> Bacterias Gram negativas
TLR6	Mon, CD, LB, ovario, pulmón	Lipopéptidos diacilados Ácido lipoteicoico Zymosan	<i>Mycoplasma</i> spp. Bacterias Gram positivas Hongos
TLR7 TLR8	Mon, CD, NK, LB, bazo, pulmón, placenta	ARN de cadena sencilla (ssARN)	Influenza, VIH-1, sarampión, Paraechovirus 1, dengue, Coxsackievirus, VEV, VHC, Paramixovirus
TLR9	Mon, CD, NK	ADN con motivos CpG	Bacterias y virus (Herpesvirus)
TLR10	Mon, CD, LB	Desconocido	Desconocido

Mon: monocitos; PMN: polimorfonucleares neutrófilos; CD: células dendríticas; LT: linfocitos T; LB: linfocitos B; NK: células asesinas naturales; VHS: virus herpes simple; VHC: virus de la hepatitis C; VEV: virus de la estomatitis vesicular; VIH-1: virus de la inmunodeficiencia humana, tipo 1.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 EMBARAZO Y TLRs.

En la actualidad poco se sabe acerca del papel de los TLRs durante el embarazo. Holmlund y col (2002), demostraron la presencia de TLR2 y TLR4 en placentas humanas normales a término por medio de tinciones inmunohistoquímicas, estableciendo que en células del sinciciotrofoblasto y del trofoblasto intermedio se expresan TLR2 y TLR4. Kumazaki y col (2004), demostraron por medio de tinciones inmunohistoquímicas que el TLR4 se localiza en células de trofoblasto extraveloso, trofoblasto intermedio y en células de Hofbauer de placentas a término y pretermino. En placentas con corioamnioitis se encontró que en células de Hofbauer hubo un aumento en la inmunoreactividad comparadas con las placentas normales.

Los TLRs pueden interactuar con microorganismos que se encuentran presentes en el sitio de implantación iniciando una respuesta inmune. Guleria y Pollar (2000), sugieren que el trofoblasto puede funcionar como un miembro activo del sistema inmune innato; ya que encontraron que las células del trofoblasto del primer trimestre expresan TLR2 y TLR4 principalmente en células del citotrofoblasto y del trofoblasto extraveloso, mientras que las células del sinciciotrofoblasto del primer trimestre no expresan los TLRs. Esto sugiere que la placenta podría servir como una barrera altamente especializada protegiendo el desarrollo del feto contra las infecciones.

En células del trofoblasto de primer trimestre se ha podido demostrar que el TLR2 y TLR4 pueden mediar funciones diferentes; el TLR4 y sus ligandos promueven la producción de citocinas, mientras que TLR2 y sus ligandos inducen apoptosis en ellas. Estos hallazgos sugieren que un patógeno puede promover directamente la muerte de células del trofoblasto a través del TLR2, fenómeno que se observa en algunas de las complicaciones durante el embarazo (Abrahams y col 2004). Por lo anterior, se puede establecer que el tipo de patógeno y la activación del receptor específico son importantes en el

tipo de respuesta generada por las células de la placenta. La placenta puede distinguir entre los microorganismos comensales y patógenos durante el embarazo. Una vez iniciado un proceso infeccioso, las células del trofoblasto positivas a TLRs, podrían promover una respuesta inmune.

### **3.2 SEÑALES DE LOS TLRs EN CELULAS DEL TROFOBLASTO**

La función de los TLRs en la interfase materno-fetal es un área aún poco explorada. Se sabe que las células del trofoblasto de placentas de término pueden producir IL-6 e IL-8 después de unirse a zimosàn o LPS que son ligandos de TLR2 y TLR4 respectivamente. En células de trofoblasto a término tratadas con LPS se induce la producción de óxido nítrico con sus potentes propiedades anti-microbiales y MMP-2 (Nakatzuka y col 2000). Estudios realizados en células de trofoblasto de primer trimestre tratadas con LPS demuestran la inducción de G-CSF y RANTES (Svinarich y col 1996). Se ha podido demostrar que la activación de TLR4 por LPS en células del trofoblasto veloso y del citotrofoblasto del primer trimestre se lleva a cabo por las vías clásicas de respuesta asociadas a este receptor, caracterizada por el aumento en la producción de citocinas pro y anti-inflamatorias. Estos estudios sugieren que las células del trofoblasto pueden inducir funciones similares a las de las células del sistema inmune innato, por el reconocimiento y respuesta a componentes de microorganismos.

### **3.3 APOPTOSIS Y TLRs EN CELULAS DEL TROFOBLASTO**

En muchos casos, una infección puede resultar en apoptosis y muerte de las células infectadas, siendo un importante aspecto de defensa. Los peptidoglicanos son el mayor componente de las bacterias gram-positivas y ligandos para TLR-2. Se ha visto que la unión del TLR-2 con los peptidoglicanos falla en la autorregulación de la producción de citocinas en las células del trofoblasto. Aunque la activación de TLR-2 induce apoptosis en las células de trofoblasto de primer trimestre (Abrahams y col 2004). Aliprantis y Col (1999), demostraron que la unión del TLR2 con lipoproteínas bacterianas tanto en la línea celular de monocitos THP-1 como las células epiteliales de

riñón conduce a la apoptosis. Otros estudios sugieren que en las células del trofoblasto de primer trimestre, la vía de apoptosis puede ser activada a través de los heterodímeros TLR-2/TLR-1 o TLR-2/TLR-6 (Into y col 2004). Otros estudios demuestran que la vía de la apoptosis por medio del TLR-2 (Aliprantis y col 2000), es a través de la activación de caspasas, y la iniciación de su vía intracelular es dependiente del dominio de muerte (DD) de MyD88. Reportes recientes demuestran que el TLR-3 también media la apoptosis, dependiente de FADD, pero de manera independiente de MyD88. Una sobre expresión de TRIF induce apoptosis mediada por FADD, sin embargo, por la falta del dominio DD en TRIF éste puede no interactuar con FADD para activar la cascada de las caspasas, para que el TRIF puede activar la vía de las caspasas, es necesaria una interacción con RIP (Han y col 2004). Hasta el momento se desconoce si TLR-3 puede mediar apoptosis en las células del trofoblasto.

### **3.4 INFECCION, TLRs Y COMPLICACIONES EN EL EMBARAZO**

Diversas alteraciones en la regulación de la apoptosis en la placenta parecen estar asociadas con embarazos anormales (Jerzak 2002). Se ha observado un aumento en la apoptosis del trofoblasto en embarazos complicados con preeclampsia y con ruptura prematura de membranas (Ishahara y col 2002 y Allaire 2000) y esto se acompaña con reducción en la invasión del trofoblasto y transformación de las arterias espirales. Además, se ha observado aumento en la apoptosis del trofoblasto en nacimientos pretérmino (Balkundi y col 2003).

Estudios clínicos muestran una asociación entre infecciones intrauterinas y partos pretérmino, preeclampsia y ruptura prematura de membranas. Por lo tanto se propone que la expresión de TLRs en la interfase materno-fetal podría tener un papel importante en el mecanismo de la patogénesis. Las bacterias gram-positivas que expresan peptidoglicanos o ácido lipoteicoico pueden promover directamente muerte celular del trofoblasto a través de TLR-2 (Abrahams y Mor 2005). Diversos autores muestran en modelos animales que embarazos complicados por la administración de LPS de bacterias gram-negativas, los LPS por medio del TLR-4, son el activador de las células del

trofoblasto de primer trimestre para la producción de niveles altos de citocinas, incluyendo TNF-alfa y INF-gama (Bennet 2000; Vizi y col 2001;). Se ha observado que las células del trofoblasto son altamente sensibles a las citocinas, lo que sugiere que la expresión de TNF-alfa y el IFN-gama en la placenta pueden inducir apoptosis celular del trofoblasto (Ho y col 1999; Crocker y col 2001). Por lo tanto, si bien los LPS no son los que inducen directamente muerte celular en el trofoblasto, la intensa respuesta inflamatoria generada por otras células inmunes de la decidua o del trofoblasto seguidas de su activación pueden proveer una alternativa en el mecanismo de inducción de muerte celular en el trofoblasto (Abrahams y Mor 2005).

### **3.5 TLRs E INMUNOLOGIA DEL PARTO PRETERMINO Y DE TÉRMINO**

Durante el embarazo la inmunidad innata en la interfase materno-fetal se encuentra en equilibrio, de manera tal que la respuesta inmune proinflamatoria es altamente regulada para prevenir daño inmunológico del feto. Una alteración del delicado balance de las citocinas por bacterias o el aumento de otros factores, aumenta la producción de citocinas pro-inflamatorias, y activa mecanismos que conducen a un parto prematuro.

Recientemente se han propuesto a los TLR2 y TLR4 como mediadores de la inflamación en la placenta y se ha sugerido un mecanismo mediante el cual participan en el parto pretérmino y de término: El TLR2 y TLR4 se activan por las proteínas de choque térmico HSP70, HSP60 y gp96 y aumentan la producción de citocinas pro inflamatorias por los macrófagos (Dybdahl y col, 2002; Asea y col, 2002; Vabulas y col, 2001, 2002). El TLR4 puede ser activado por la fibronectina inducida por el estrés y estimular la producción de MMP-9 por células THP-1 (Okamura y col 2001). El fibrinògeno extravascular puede también modular la producción de citocinas por los macrófagos vía TLR4 (Smiley y col 2001). Estas citocinas pueden aumentar la producción de otros mediadores de la inflamación como prostaglandinas y metaloproteinasas de matriz, así como el reclutamiento de macrófagos y neutrófilos, pudiendo afectar diferentes tejidos. En el miometrio las prostaglandinas aumentan las contracciones uterinas y las metaloproteinasas pueden contribuir al

desprendimiento de la placenta. En el cervix estos mediadores causan degradación de la matriz extracelular ocasionando el borramiento y la dilatación del cervix. El aumento de la actividad de las metaloproteinasas en las membranas reduce la tensión requerida para su ruptura. La progesterona y la IL-10 actúan como sustancias inmunosupresoras suprimiendo la cascada proinflamatoria y otros reguladores como el TIMPs y PGDH también pueden ser importantes en el embarazo prolongado. La habilidad de las células para responder a mediadores endógenos de la inflamación es compatible con el modelo de daño inmunológico. Este modelo se basa en que la inmunidad tiene la capacidad de destruir los antígenos, pero también es capaz de producir daño. Este modelo se basa en numerosas observaciones en donde el tejido lesionado o necrosis se asocia con respuesta inmune exacerbada (Peltier 2003).

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Poco se sabe acerca de las funciones de los TLRs en el embarazo, sin embargo, se ha sugerido que podrían participar en procesos inflamatorios en las células del trofoblasto induciendo la producción de citocinas, al ser activados por diferentes ligandos. Los más estudiados durante el embarazo son el TLR2 y TLR4, localizados en membrana celular, que en procesos infecciosos pueden ocasionar disturbios en la respuesta inmune local a nivel de la interfase materno-fetal.

Se ha determinado la localización de TLR2 y TLR4 en pacientes normales y con diferentes patologías agregadas a un embarazo como corioamnioitis o vaginitis, sin embargo hasta la fecha continúan las controversias del efecto de su localización, pues algunos autores describen por inmunohistoquímica la presencia de TLRs en placentas a término normales (Holmlund y col. 2002), y otros solo detectan TLRs en placentas con corioamnioitis (Kumazaki y col. 2004). Kim y col (2005) establecen por inmunohistoquímica la presencia de TLR4 en placentas a término y pretérmino de pacientes normales, con preeclampsia y corioamnioitis, determinando la mayor expresión en las placentas con preeclampsia. Estos autores no detectan diferencias en la expresión de TLR2 en los diferentes grupos estudiados. Abrahams y col (2005), describen la presencia de TLR3 y TLR4 en placentas de primer trimestre de embarazo en el citotrofoblasto y en el sinciotrofoblasto con un aumento importante de citocinas. La expresión de TLR9 no se ha analizado en placentas humanas.

Es importante considerar que durante el embarazo, aumenta la susceptibilidad a las infecciones recurrentes en la madre, siendo estas de predominio bacteriano. Ahora bien, la hipertensión arterial sistémica es una enfermedad crónica degenerativa que se ha vuelto uno de los problemas de salud pública más frecuentes en México. En pacientes embarazadas, al cursar con elevaciones de la presión arterial sistémica, genera un serio problema por el descontrol metabólico y hemodinámico que conlleva a la predisposición de

patologías en el tercer trimestre de embarazo, propiciando preeclampsia o eclampsia, con la consecuente complicación en la interfase materno fetal, que puede ocasionar hasta la muerte en el binomio (madre-hijo).

También se ha descrito una asociación entre las infecciones de las vías urinarias, vaginales o intrauterinas con partos pretérmino, preeclampsia y ruptura prematura de membranas. La posibilidad de que los agentes infecciosos incrementen la expresión de los TLRs en la interfase materno-fetal y puedan tener un papel importante en el mecanismo de la patogénesis de la preeclampsia queda latente. De tal manera que para entender aún mejor el papel de la inmunidad innata en la interfase materno-fetal, nos propusimos determinar si existen cambios o diferencias en la expresión de TLR2, TLR3, TLR4 y TLR9 en placentas de pacientes normales y con preeclampsia.

En este trabajo estudiamos la localización por inmunofluorescencia de TLR2, TLR3, TLR4 y TLR9 en placentas de pacientes normales a término y en pacientes embarazadas a término con preeclampsia. Es importante mencionar que, además de analizar la expresión de un mayor número de TLRs en comparación con los estudios realizados hasta la fecha, la localización en la célula de estos cuatro receptores es diferente ya que el TLR2 y el TLR4 se localizan en la membrana celular, el TLR3 y el TLR9 son de localización intracitoplásmica, los cuatro se unen a ligandos diferentes, por lo que se podrá tener un panorama más amplio en la expresión y localización de estos TLRs, aportando así mas información útil para ayudar a entender aún más las posibilidades de actuar de la respuesta inmune innata en la interfase materno-fetal durante el embarazo normal y en las pacientes con preeclampsia. Se utilizo una metodología más sensible al emplear el microscopio confocal, ya que se logra obtener una mayor sensibilidad para la detección de los anticuerpos con inmunofluorescencia en comparación con la técnica de inmunohistoquímica no fluorescente; además se tiene la ventaja de poder hacer co-localización de los receptores.

## 5. JUSTIFICACION

Existe controversia en relación a la expresión localización y distribución de TLR2 y 4 en células del trofoblasto de placentas a término de embarazos normales, y se ha sugerido un incremento en la expresión de TLR4 en pacientes con preeclampsia y corioamnioititis. No se ha estudiado TLR9 en placentas con preeclampsia. El TLR3 solo se ha detectado en placentas de embarazos de primer trimestre. Además, existen reportes en la literatura en los que se ha visto clínicamente una asociación entre las infecciones intrauterinas y la preeclampsia. Por lo que es posible que en condiciones en las que se activa la respuesta inmune innata y se obtiene como resultado final un incremento en citocinas proinflamatorias y proteínas de la fase aguda, exista un aumento en la expresión de algunos TLRs.

## 6. HIPOTESIS

En las placentas de pacientes con preeclampsia, en las que existe un proceso inflamatorio local en células del trofoblasto, la expresión de TLR2, TLR4, TLR3 y TLR9 estarán incrementados en comparación con placentas de pacientes normales, lo que conllevaría a un aumento en la respuesta inflamatoria en la interfase materno-fetal.

## 7. OBJETIVOS

- 1.- Determinar la localización y distribución de TLR2, TLR3, TLR4 y TLR9 en placentas normales, por inmunofluorescencia y microscopia confocal.
- 2.- Analizar si existen cambios en la expresión y localización de TLR2, TLR3, TLR4 y TLR9 en placentas de pacientes normales con respecto a las pacientes con preeclampsia.

## 8. MATERIAL Y METODOS:

Se obtuvieron placentas de pacientes embarazadas a término de 38 a 40 semanas de gestación normales ( $n=5$ ), y de pacientes embarazadas a término con preeclampsia ( $n=5$ ), previa autorización con consentimiento informado por parte de las pacientes y con autorización del comité de ética de la institución de salud que las otorgó (Hospital General de Zona No. 60 y Hospital General Regional No. 72 del Instituto Mexicano del Seguro Social). Las placentas fueron conservadas en solución fisiológica a 4° C. para su traslado al laboratorio de inmunología en mucosas en la UBIMED de la FES-Iztacala.

De las placentas se obtuvieron 5 muestras de 1.0 cm. cúbico de cotiledones cercanos a la inserción de cordón umbilical. Se realizaron lavados con solución salina 3 veces con agitación continua (80 rpm) por 15 minutos y se fijaron con 50 ml de sales de zinc (FSZ) realizando dos cambios de 48 h c/u (González y col 1991). Posteriormente se procesaron mediante la técnica histológica de rutina, deshidratando con alcoholes en concentración creciente (70, 80, 90, y 100%) por 30 minutos c/u, para ser transferidos a líquido intermedio de butanol por 24 h, seguido por inmersión en parafina 2 veces por 24 h c/u y finalmente se incluyeron en Paraplast.

Se hicieron cortes a 5 micrómetros en un micrótomo de rotación. Los cortes fueron colectados en laminillas recubiertas con poli-L-lisina (Sigma, Chem. St. Louis MO) al 10 % en agua desionizada, se desparafinaron en xilol (2x15 minutos cada uno), para después ser hidratadas en alcoholes decrecientes (100, 90, 80 y 70 %, 3 minutos cada uno). Se realizó la recuperación antigénica con urea al 5% en agua por 30 minutos a temperatura ambiente. Se bloquearon con suero de bovino al 7% en PBS-Tritón al 0.07% v/v durante 1 hora a temperatura ambiente, y para permeabilizar se utilizó PBS-Tritón X-100 0.07% v/v (Bio-Rad Lab. Ca) por 5 minutos. Las laminillas se incubaron por 24 horas a 4° C utilizando anticuerpos contra TLR2 (TLR2.3) Phicoeritrin (Santa Cruz Biotechnology, CA.), TLR4 (HTA125) FITC (Santa Cruz Biotechnology, CA.) TLR3 (TLR3.7) FITC (Santa Cruz Biotechnology, CA.), TLR9 Anti-humano

PE (eBioscience, San Diego Ca.), a diluciones 1:50 con PBS-Tritón X-100 0.07% v/v, una vez concluida la incubación se deshidrataron en alcoholes crecientes (70, 80, 90, 100 % 3 minutos cada uno), y se montaron en Entellan (Merck, Darmstadt) y fueron analizados con el microscopio confocal Leica Microsystems (Leica, Wetzlar).

Las imágenes mostradas fueron las representativas para cada caso. Adicionalmente se tuvo para cada caso un control negativo de placenta normal, la cual se procesó con la misma metodología pero sin agregar el anticuerpo, para poder eliminar la autofluorescencia de las muestras.

Se midió la intensidad de fluorescencia de las placentas control y con preeclampsia en 5 regiones diferentes con ayuda del software Leica confocal y se analizaron los datos obtenidos con ANOVA de dos vías utilizando el programa graphpad prism.

## 9. RESULTADOS

En las placentas de las 5 pacientes con embarazos normales y en las 5 de pacientes con preeclampsia, se detectó por inmunofluorescencia la expresión de TLR2, TLR4, TLR3 y TLR9. Se encontraron diferencias en el patrón de localización e intensidad de reacción de los distintos TLRs analizados. En general, en las placentas controles se observó que la expresión de TLR2, TLR4, TLR3 y TLR9, fue menor en comparación con lo observado en las placentas de pacientes con preeclampsia.

La figura 1, muestra una vellosidad corionica normal, teñida con la técnica de hematoxilina y eosina, en la cual se pueden apreciar las diferentes estructuras que la componen.

Al ser analizadas con la técnica de hematoxilina – eosina se observó un notable aumento en la densidad del estroma veloso y el número de nodos sinciciales en las placentas con preeclampsia en comparación con placentas control (Fig.2).

La expresión de TLR2 en las placentas control se limita a la zona apical de las células del trofoblasto con mínima expresión en el endotelio vascular, mientras que en las placentas con preeclampsia fue detectado en el trofoblasto (sincicio) abarcando todo el entorno celular y muy notorio en el endotelio vascular del estroma (Fig. 3).

La expresión de TLR4 en las placentas control fue menos intensa tanto en el trofoblasto como en el endotelio vascular a diferencia de lo observado en las placentas con preeclampsia, las cuales mostraron un aumento evidente en la expresión de este receptor tanto en el trofoblasto como en el endotelio vascular del estroma de la vellosidad (Fig. 4).

Cuando se analizó la expresión simultánea de los dos receptores (Fig.5), se observa que existe una co-localización del TLR2 y TLR4, lo que significa que ambos receptores se están expresando en el mismo sitio, tanto en las células

del trofoblasto como en el endotelio vascular del estroma, aunque se pudo apreciar que el TLR2 predomina en el endotelio vascular, con un aumento notorio de la intensidad en la expresión en placentas con preeclampsia.

El TLR3 en placentas control se expresa en la zona apical de las células del trofoblasto con mínima expresión en el endotelio vascular. En placentas con preeclampsia, se observa un marcado aumento en la expresión en el sincicio y se expresa con mayor intensidad en el endotelio vascular (Fig. 6).

El TLR9 en placentas normales y en placentas con preeclampsia se expresa en el trofoblasto y en el endotelio vascular aunque hay una gran diferencia en cuanto a la intensidad de la expresión observando que es mayor en las placentas con preeclampsia (Fig. 7).

Al analizar la expresión conjunta de los receptores TLR3 y TLR9 (Fig. 8), se detecta una co-localización de ambos, lo que significa que los dos receptores están localizados en el mismo sitio, tanto en las células del trofoblasto como en el endotelio vascular del estroma. Sin embargo, en el endotelio vascular se aprecia una mayor intensidad en la expresión del TLR9 tanto en las placentas control como en las placentas con preeclampsia.

El análisis estadístico de la intensidad de inmunofluorescencia confirmó que la expresión de los TLR2, 3, 4, y 9 es significativamente mayor en las placentas con preeclampsia con respecto a los controles (Fig. 9).

## VELLOSIDAD CORIONICA

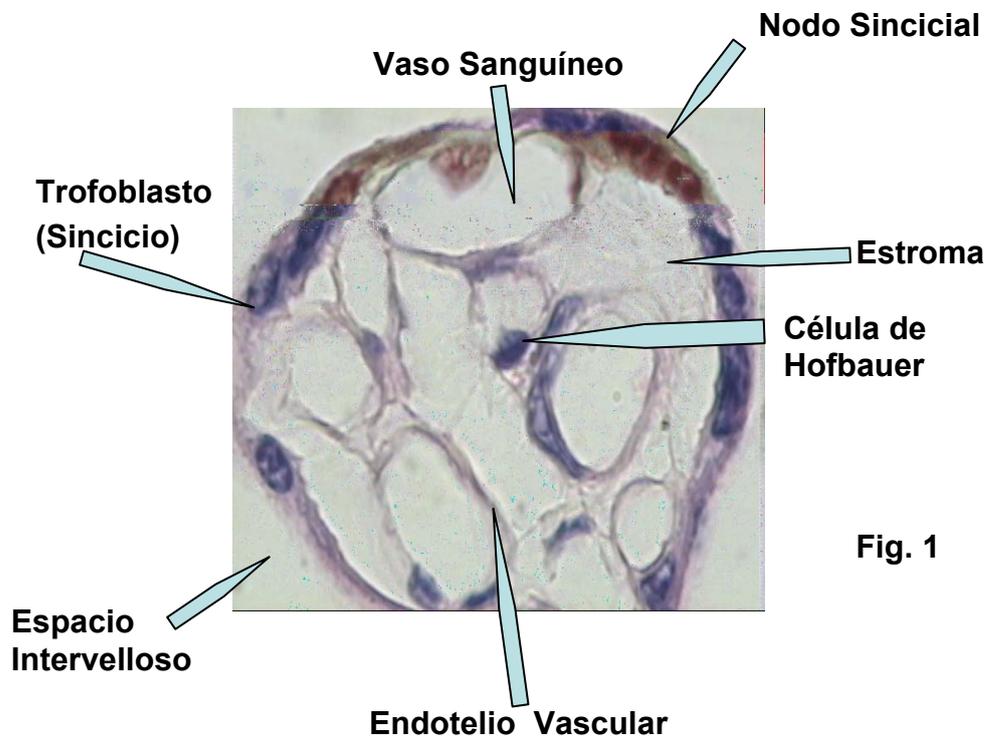


Fig. 1

Figura 1. Muestra la estructura de las vellosidades coriónicas de una placenta a término teñida con hematoxilina y eosina. (500x).

## PLACENTAS CON LA TÉCNICA DE H-E

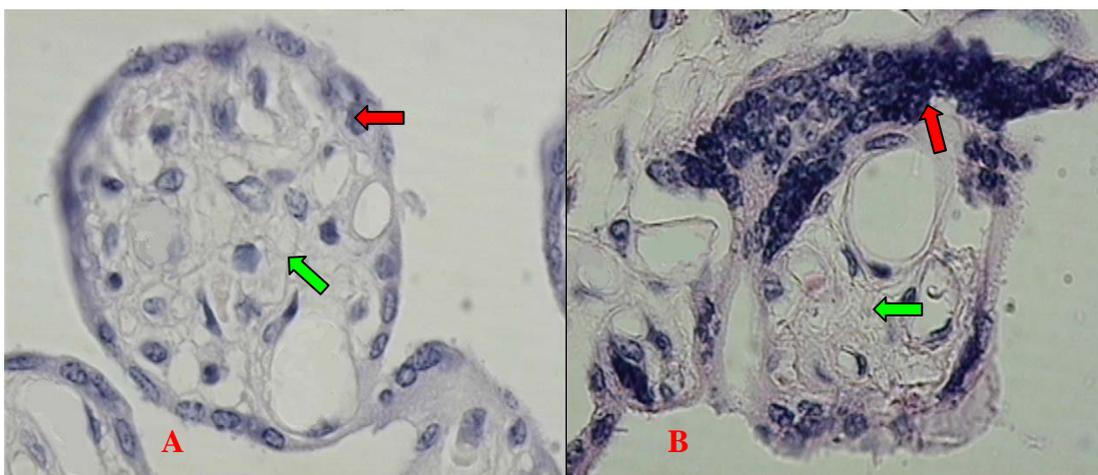


Fig. 2. Placenta control (A) y placenta con preeclampsia (B) con H-E. Se observa la diferencia en relación a la cantidad de nodos sinciciales (flechas rojas) y densidad del estroma (flechas verdes). (1000x).

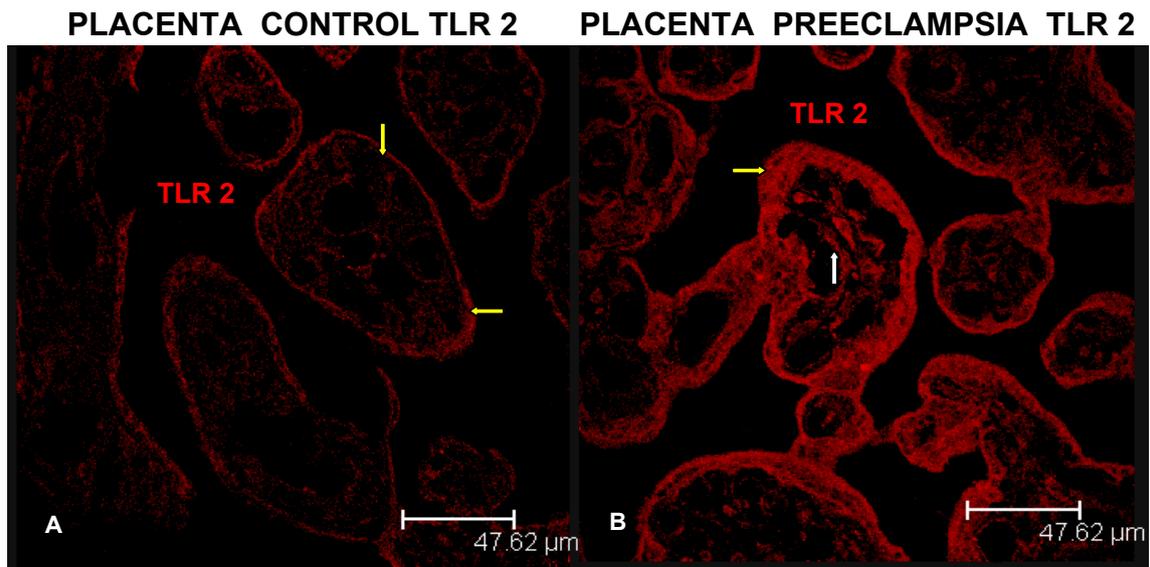


Fig. 3. La expresión de TLR 2 en placenta control (A) y con preeclampsia (B). Es menor la expresión en las placentas control en comparación con las placentas de paciente con preeclampsia predominando en el trofoblasto (flechas amarillas) y en el endotelio vascular del estroma (flechas blancas)

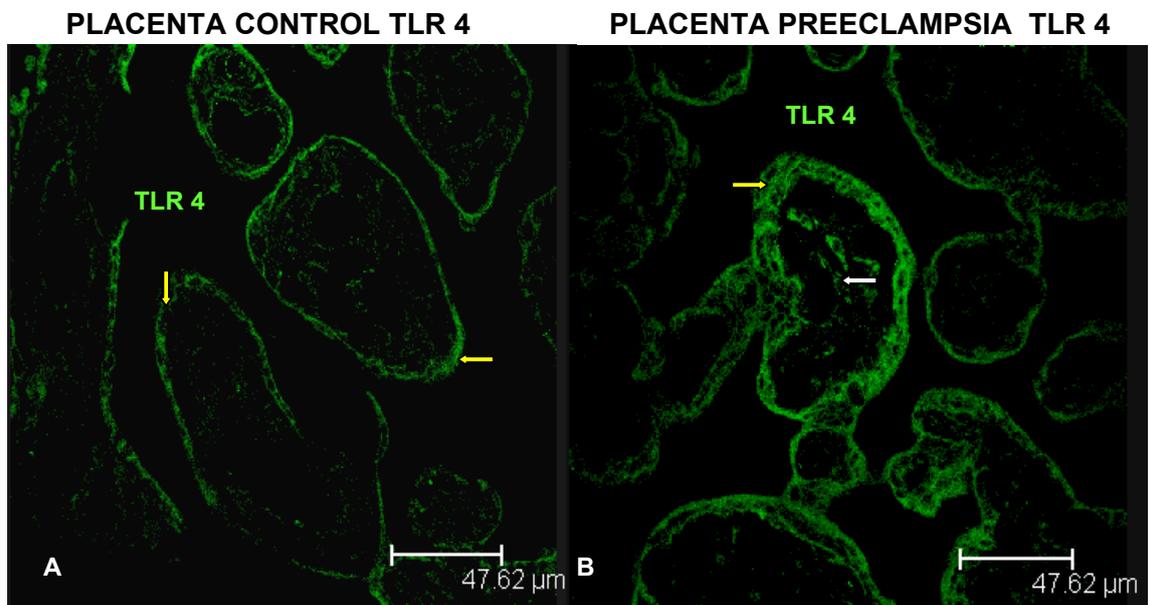


Fig.4. Expresión de TLR 4, en placenta control (A) y placenta con preeclampsia (B). Es menos intensa en las placentas control, con aumento notorio en el endotelio vascular del estroma (flechas blancas) y el trofoblasto (flechas amarillas) en las placentas con

## PLACENTA CONTROL TLR 2-4

## PLACENTA PREECLAMPSIA TLR 2-4

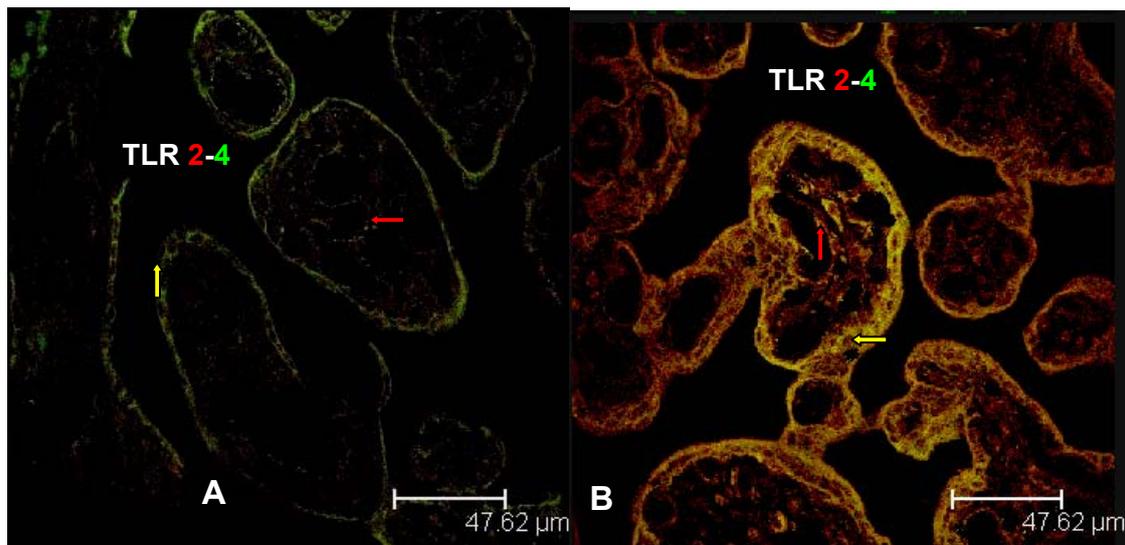


Fig. 5. Co-localización de los receptores TLR2 y TLR4 (flechas amarillas). Placenta control (A) y placenta con preeclampsia (B) observando aumento de la expresión en las placentas con preeclampsia en comparación con las placentas control, además se observa predominio de TLR2 en el endotelio vascular (flechas rojas).

## PLACENTA CONTROL TLR 3

## PLACENTA PREECLAMPSIA TLR3

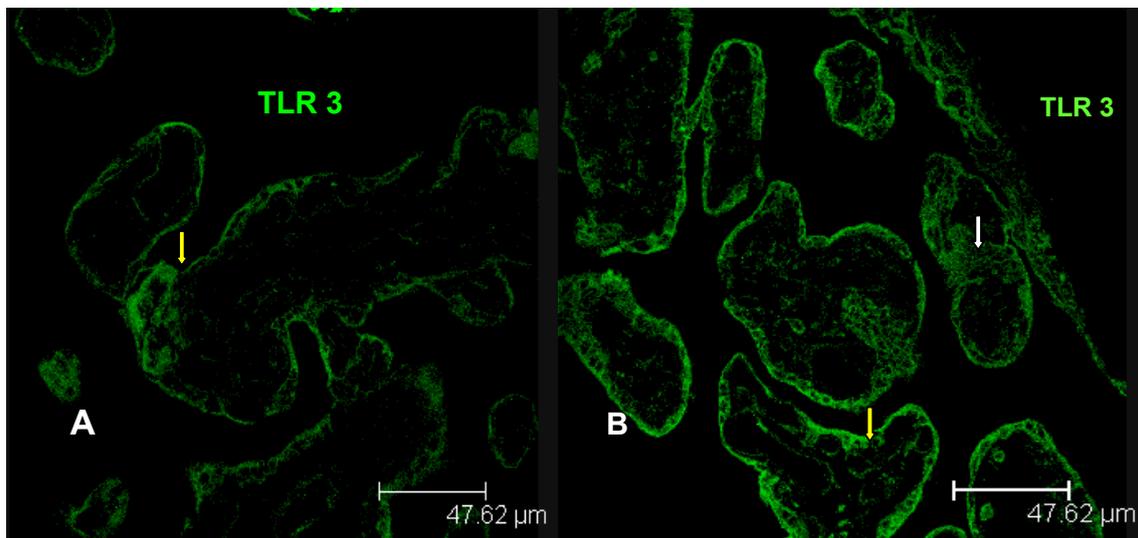


Fig. 6. Expresión y localización del TLR3 en placenta control (A) y con preeclampsia (B). Con diferencia en las expresión predominando en las placentas con preeclampsia en el sincicio (flechas amarillas) y en el endotelio vascular (flechas blancas) en comparación con las placentas control.

PLACENTA CONTROL TLR 9

PLACENTA PREECLAMPSIA TLR9

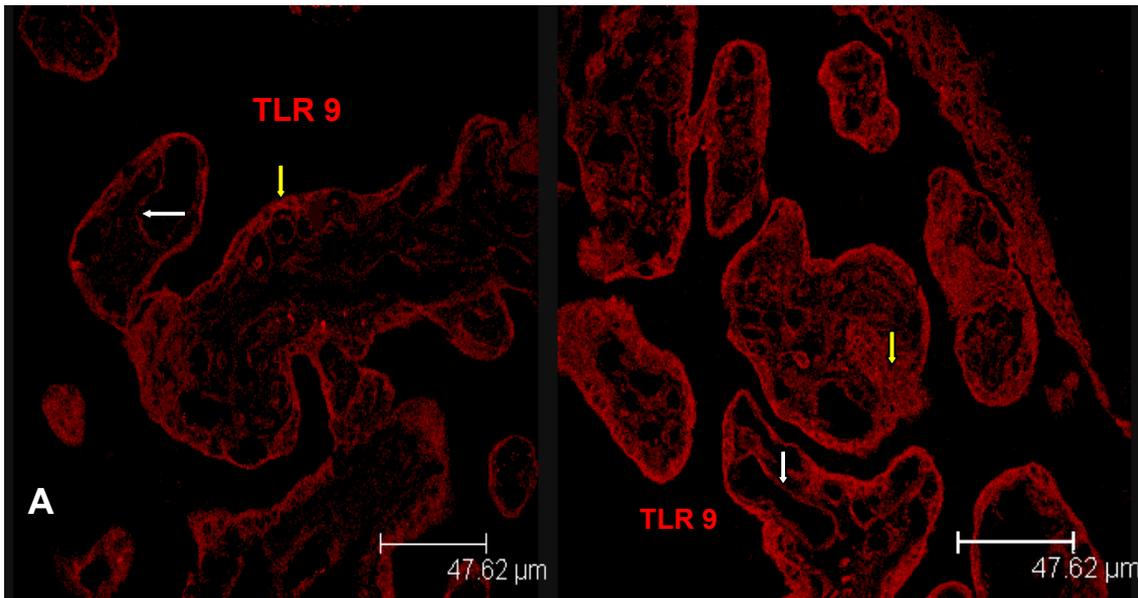


Fig. 7. Expresión y localización de TLR9 en placenta control (A) y con preeclampsia (B), de predominio en trofoblasto (flechas amarillas) y en el endotelio vascular del estroma (flechas blancas).

PLACENTA CONTROL TLR 3-9

PLACENTA PREECLAMPSIA TLR 3-9

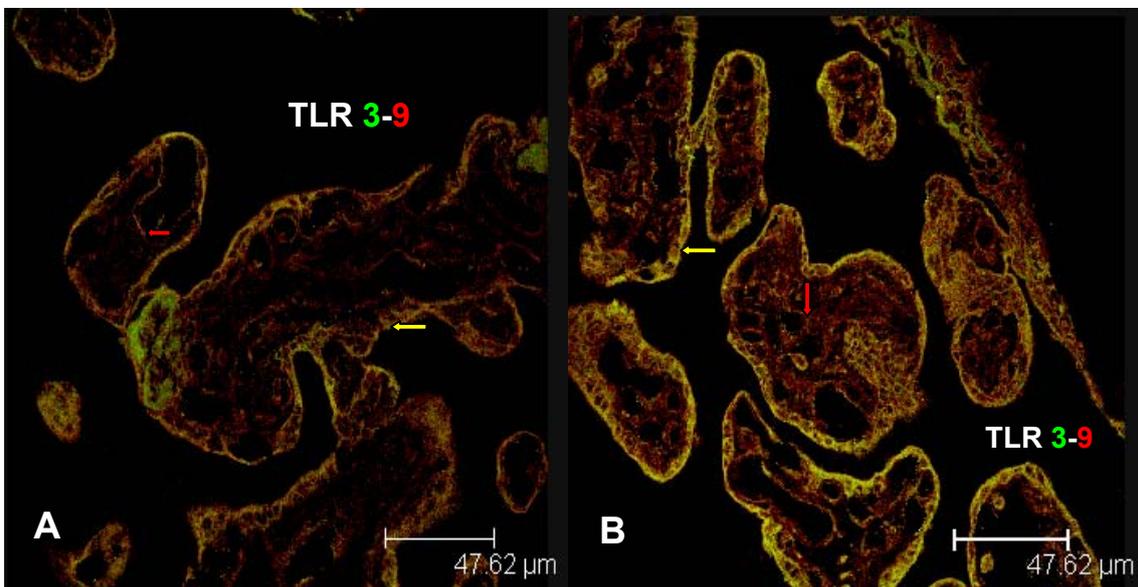


Fig. 8. Distribución de la expresión de los TLR3 y TLR 9 en placentas. Control (A) y en placenta de pacientes con preeclampsia (B), obsérvese la co-localización de TLR3-9 (flechas amarillas), y la localización de TLR9 en el endotelio vascular del estroma (flechas rojas)

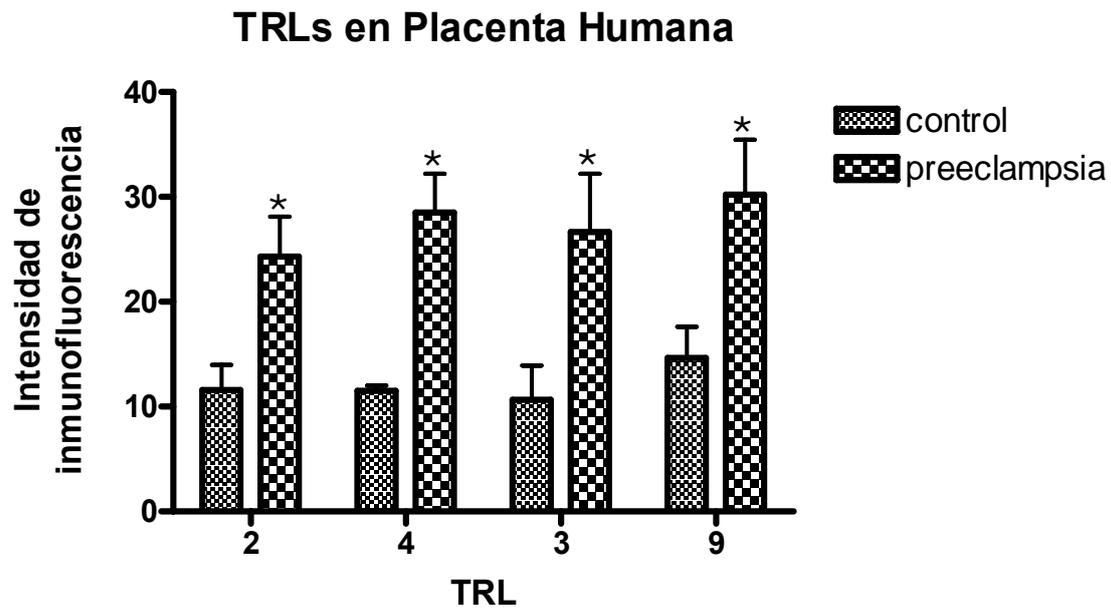


Figura 9. Diferencias en la expresión de los TLRs en placentas control y con preeclampsia. La intensidad de fluorescencia relativa se calculó en 5 diferentes áreas de cada corte de las placentas con el software Leica con focal. En los datos presentados se representan como la media de la intensidad de fluorescencia  $\pm$  la desviación estándar de las 5 placentas por grupo. Los datos se analizaron con una anova de dos vías usando el programa graphpad prism. (\*) Indica las diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) para cada TLR con respecto a su expresión en placenta control.

## 10. DISCUSION

En el presente trabajo se logró determinar mediante la técnica de microscopia confocal la presencia de TLR2, TLR4, TLR3 y TLR9 en todas las placentas analizadas, tanto de embarazos normales como de preeclampsia. En ambos grupos se observó que la distribución de los receptores se presentó preferentemente en el trofoblasto (sincicio) y en el endotelio vascular del estroma vellosos. En la mayoría de los casos se detecta un claro aumento en la expresión de los receptores en las placentas con preeclampsia con respecto a las placentas control. Aunque una de las placentas control examinada mostró una expresión similar a la observada en las placentas con preeclampsia. Asimismo, se pudo apreciar que es mayor la expresión de TLR2 y TLR9 en el endotelio vascular del estroma vellosos.

Mediante microscopia confocal también se logró determinar que existe una colocalización de los receptores TLR2 y TLR4 así como de TLR3 y TLR9, hallazgos que no se habían descrito.

Algunos estudios con inmunohistoquímica sugieren la presencia de TLR4 en citotrofoblasto y sinciotrofoblasto en placentas de pretérmino con y sin proceso infeccioso. En placentas a término existe controversia, ya que algunos autores han descrito que el TLR4 se localiza en trofoblasto extraveloso de placentas con proceso infeccioso, pero no en placentas normales (Kumazaki y col. 2004), mientras que Holmound y sus colaboradores (2002) establecen una fuerte inmunoreactividad de TLR2 y TLR4 en trofoblasto de las vellosidades de placentas normales, y detectan que en cultivo de placentas normales estimuladas con lipopolisacárido (LPS) o zymosan se induce la producción de IL-6 e IL-8 sin que se modifique la expresión de los TLR. Mientras que Abrahams y col 2005, determinan la presencia de TLR3 y TLR4 en placentas de primer trimestre de embarazo en el citotrofoblasto y en el sinciotrofoblasto con un aumento importante de citocinas. En este trabajo se determinó la presencia de TLR3 y TLR9 en placentas a término normales y con preeclampsia, observando una expresión en ambos pero con un aumento

notorio en las placentas con preeclampsia, logrando establecer que se colocaliza, mientras que en el endotelio vascular se expresa más el TLR9 que el TLR3 por lo que ambos pueden tener relevancia en el curso del embarazo.

Al analizar por inmunohistoquímica la presencia de TLR2 y TLR4 en placentas pretermino normales, con corioamnionitis y con preeclampsia (Kim y col 2005) se encontró que la presencia de TLR4 tuvo una expresión altamente elevada en placentas con preeclampsia, en comparación con los otros grupos estudiados, mientras que con TLR2 no encontraron diferencias significativas en los diferentes grupos estudiados. En el presente trabajo se determinó la presencia de TLR2 en placentas control con un marcado aumento en la expresión en placentas con preeclampsia, y se pudo apreciar que existe una colocalización tanto en el trofoblasto como en el endotelio vascular de TLR2 y TLR4, y que el TLR2 se expresa más en el endotelio vascular de ambas placentas por lo que nuestros resultados difieren de lo establecido por estos autores.

Con la técnica utilizada de microscopia confocal se logra tener una mayor sensibilidad en la detección de receptores, permitiendo además determinar la localización de una o más moléculas en la célula, para ello la molécula debe estar marcada con fluorescencia, lo que nos permite hacer colocalización de receptores, en comparación con la técnica de inmunohistoquímica que utiliza un microscopio convencional. Las imágenes del microscopio confocal son notablemente superiores a las que se obtienen con el microscopio convencional (Sánchez 2007), y las diferencias se pueden explicar por la sensibilidad de la técnica en comparación con las utilizadas por otros autores.

Se sabe que en las placentas de pacientes con preeclampsia existen cambios histopatológicos caracterizados por el aumento en la densidad del estroma veloso, aumento en el número de nodos sincitiales o fenómeno de Teny Park (Heazell y col. 2007) y endoarteritis de los vasos sanguíneos como consecuencia de hipoxia celular. Nuestros resultados indican que existe un claro aumento de los TLRs en la preeclampsia, es entonces determinante el saber si estos cambios histopatológicos pudieran estar dados por el aumento

de los TLRs o si los cambios descritos condicionan el aumento en la expresión de los receptores, y si de alguna manera se pueden ligar a la patogenia de la preeclampsia.

Probablemente en presencia de un proceso infeccioso en la placenta se produce un aumento en la expresión de receptores Toll que al ser estimulados por sus diferentes ligandos como lipopolisacáridos, lipopéptidos, lipoproteínas, proteínas de choque térmico etc., la respuesta inmune innata en la unidad feto placentaria genera una reacción inflamatoria aguda local mediada por las vías clásicas de MyD88, TICAM y TIRAP, obteniendo finalmente síntesis y liberación de IL-6, IL-12, TNF-alfa y el IFN-gama en el trofoblasto, y probablemente mediante este proceso se ligue a dichos receptores con la patogenia de la preeclampsia.

Se sabe que en la preeclampsia las células del trofoblasto tienen acelerado el proceso de apoptosis cuyos principales protagonistas son las caspasas de las cuales la caspasa 3, caspasa 6, y caspasa 7 se unen a una variedad de proteínas vitales celulares, incluyendo enzimas reparadoras de DNA, laminas nucleares y proteínas del citoesqueleto; lo que puede explicar las características de la apoptosis tales como condensación nuclear, debilitamiento de la membrana, y encogimiento celular. Histológicamente la apoptosis se caracteriza por el aumento de nodos sinciciales (Alexander y col 2000; Haesel Y col. 2005), y si el patrón de expresión de TLR3 y TLR4 es detectado en este trabajo predominantemente en el sincicio, y en los nodos sinciciales, entonces se puede sugerir que en las células apoptóticas está aumentada la expresión de los TLR3 y TLR4, y si estos dos receptores y el TLR2 participan induciendo el proceso de muerte celular programada en células del trofoblasto mediante la expresión de TNF-alfa (que es un potente inductor de apoptosis en el trofoblasto) y el IFN-beta los cuales tienen efecto apoptótico, al unirse el TNF-alfa a su receptor TNF-R1 (Ho y col, 2001; Crocker y col, 2001), se desencadene la cascada de las caspasas. Es entonces muy probable que se conjunten la respuesta inmune innata y el proceso de apoptosis por las diferentes vías de acción de los TLRs y actúen en la interfase materno fetal para dar inicio a la patogenia de algunas enfermedades ligadas al embarazo

como la preeclampsia, el retardo en el crecimiento fetal y el desprendimiento prematuro de la placenta así como los partos prematuros, a donde el común denominador de estas patologías es la función y desarrollo anormal de la placenta. Por lo tanto y en base a lo descrito podemos sugerir que una detección oportuna de las infecciones en las pacientes embarazadas y un tratamiento oportuno podrían disminuir los riesgos.

Pero será necesario seguir investigando la respuesta inmune innata en la interfase materno fetal para poder establecer la participación real de estos receptores en la patógena de la preeclampsia y probablemente en otras enfermedades ligadas al embarazo como el desprendimiento prematuro de placenta, el retardo en el crecimiento fetal etc.

## 11. CONCLUSIONES

Por los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir:

- ✚ Hay expresión del TLR2 y TLR4 tanto en placentas normales como en placentas con preeclampsia.
- ✚ Es evidente el aumento en la expresión de TLR2 y TLR4 en las placentas con preeclampsia en comparación con las normales.
- ✚ Existe una colocalización de receptores TLR2 y TLR4 en trofoblasto y en endotelio vascular del estroma veloso.
- ✚ Predomina el TLR2 en el endotelio vascular y en el estroma.
- ✚ Hay expresión de TLR3 y TLR9 en placentas normales y en placentas con preeclampsia, con aumento en la expresión en las placentas con preeclampsia.
- ✚ Existe co-localización de receptores TLR3 y TLR9 en el trofoblasto, pero se pudo apreciar que el TLR9 se expresa en mayor proporción en el endotelio vascular del estroma y en el estroma.

## 12. PERSPECTIVA

De existir una verdadera relación entre TLRs - infección - preeclampsia, será entonces necesaria una verdadera prevención y una detección oportuna de los procesos infecciosos en las pacientes embarazadas.

## 12. REFERENCIAS

Abrahams V.M., Bole-Aldo P., Kim Y.M., Straszewski-Chavez S.L., Chaiworapongsa T., Romero R., Mor G. Divergent trophoblast responses to bacterial products mediated by TLRs. *J. Immunol.* 173: 4286-4296 (2004).

Abrahams VM, Mor G. Toll-like receptors and their role in the trophoblast. *Placenta* 26: 540–547 (2005).

Akira S. Toll-like receptors signalling. *J. Biol. Chem.* 278: 38105-38108 (2003).

Aliprantis A.O., Yang R.B., Mark M.R., Suggest S., Devaux B., Radolf J.D. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 258: 736-739 (1999).

Aliprantis A.O., Yang R.B., Weiss D.S., Godowski P., Zychlinsky A. The apoptotic signaling pathway activated by toll-like receptor-2. *EMBO J.* 19: 3325-3336 (2000).

Allaire A.D. Ballenger K.A. Wells S.R., McMahon M.J., Lessey B.A. Placental apoptosis in preeclampsia. *Obstet. Gynecol.* 96: 271-276 (2000).

Asea A., Rehli M., kabingu E., Boch J.A., Bare O., Auron P.E., Stevenson M.A., Calderwood S.K. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70. *J. Biol. Chem.* 277: 15028-15034 (2002).

Balkundi D.R., Ziegler J.A., Watchko J.F., Craven C., Trucco M. Regulation of FasL/Fas in human trophoblast: possible implications for chorioamnionitis. *Biol. Reprod.* 69: 718-724 (2003).

Bell J. K., Botos I., Hall P.R., Askin J., Shiloach J., Segal D. M., Davis D. R. The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain. *Immunology.* 102: 10976-10980 (2005).

Bell J. K., Askins J., Hall P. R., Davies D. R., Segal D. M. The dsRNA binding site of human Toll-like receptor 3. *Biol. Sci. Immunol.* 103: 8792-8797 (2006).

Bennet W.A., Torrene D.A., Rinehart B.K., Kassab S., Martin Jr. J.N., Granger J.P. Intrauterine endotoxin infusion in rat pregnancy induces preterm delivery and increases placental prostaglandin F2 alfa metabolite leves. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 182: 1496-1501 (2000).

Brightbill H. D., Modlin R. L. Toll-like receptors: molecular mechanisms of the mammalian immune response. *Immunology.* 101: 1-10 (2000)

Chaudhary P.M., Ferguson C., Nguyen V. Cloning and characterization of two Toll/interleukin-1 receptor-like genes TIL3 and TIL4: evidence for a multi-gene receptor family in humans. *Blood* 91: 4020-4027 (1998).

Crocker I.P., Barratt S., Kaur M., Baker P.N. The in-vitro characterization of induced apoptosis in placental cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts. *Placenta* 22: 822-830 (2001).

Da Silva Correia J., Soldau K., Christen U., Tobias P.S., Ulevitch R.J. Lopopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. Transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J. Biol. Chem.* 276: 21129-21135 (2001).

Diebold S. S., Kaisho T., Hemmi H., Akira S., Reis E., Sousa C. Innate antiviral response by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303: 1529 (2004).

Dybdahl B., Wahba A., Lien E., Flo T.H., Waage A., Quershi N., Sellevold O.F.M., Espevik T., Sundan A. Inflammatory response after open heart surgery. Release of heat-shock protein 70 and signalling through toll-like receptor-4. *Circulation.* 105: 685-690 (2002).

Gao, B., Tsan M. F. Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (HSP70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor alfa release by murine macrophages. *J. Biol. Chem.* 278: 174-179 (2003).

Gewirtz A.T., Navas T.A., Lyons S., Godowski P. J., Madara L. Cutting edge: bacterial flagelin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J. Biol. Chem.* 276: 1882-1885 (2001).

Gonzalez L., Anderson I., Deane D., Semmers C., Buxton D. Detection of immune system cells in paraffin wax-embedded ovine tissues. *J. Comp. Pathol.* 125: 41-47 (2001).

Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111: 927-930 (2002).

Guleria I. And Pollard. The trophoblast is a component of the innate immune system during pregnancy. *Nat. Med.* 6. 589-593 (2000).

Han K.J., Su X., Xu L.G., Bin L.H., Zhang J., Shu H.B. Mechanisms of the TRIF-induced interferon-stimulated response element and NF-kappa B activation and apoptosis pathway. *J. Biol. Chem.* 279: 15652-15661 (2004).

Hashimoto C. Hudson K.I., Anderson K.V. The toll of drosophila. Required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a trans-membrana protein. *Cell* 52: 269-279 (1988).

Hayashi F. The innate immune response to bacterial flagelin is mediated by Toll-like receptor-5. *Nature* 410: 1099-1104 (2001).

Heazel A.E.P., Moll S.J., June C.J.P., Baker P.N., Croker I.P. Formation of Syncytial is Increased by Hyperoxia, Hipoxia and Reactive oxygen Species. *Placenta* 28: S33-S40 (2007)

Heil F. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus Ixoribine uncovers a strong relationship within the TLR7,8 and 9 subfamily, *Eur. J. Immunol.* 33: 2987-2992 (2003).

Heil F. Species-Specific recognition of single-stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303: 1526-1528 (2004).

Ho S., Winkler-Lowen B., Morrish D.W., Dakour J., Li H., Guilbert L.J. The role of Bcl-2 expression in EGF inhibition of TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -induced villous trophoblast apoptosis. *Placenta*. 20: 423-430 (1999).

Holmlund U., Cebers G., Dahlforst A.R., Standstedt B., Bremme K., Ekstrom E.S., Scheynius A. Expression and regulation of the pattern recognition receptors Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in the human placenta. *Immunology*. 10: 145-150 (2002).

Into T., Kiura K., Yasuda M., Kataoka H., Inoue N., Hasebe A. Stimulation of human Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR6 with membrane lipoproteins of *Mycoplasma fermentans* induces apoptotic cell death after NF- $\kappa$ B activation. *Cell Microbiol.* 6: 187-199 (2004).

Ishahara N., Matsuo H., Murakoshi H., Laoag-Fernandez J.B., Sato T., Mauro T. Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by preeclampsia or intrauterine growth retardation. *Am. Obstet. Gynecol.* 186: 156-166 (2002).

Janeway, C. A., Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 197-216 (2002).

Jerzark M., Bischof P. Apoptosis in the first trimester human placenta: the role in maintaining immune privilege at the maternal-fetal interface and in the trophoblast remodelling. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 100: 138-142 (2002).

Jian Q., Akashi S., Miyake K., Petty. Cutting Edge: Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF- $\kappa$ B. *J. Immunol.* 165: 3541-3544 (2000).

Jurk M., Heil F., Vollmer J., Schetter C., Krieg A.M. Wagner H., Lipford G., Bauer S. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat. Immunol.* 3: 499-503 (2002).

Kakinuma C., Kuwayama C., Kaga N., Futamura Y., Katsuki Y., Shibitani Y. Trophoblastic apoptosis in mice with preterm delivery and its suppression by urinary trypsin inhibitor. *Obstet. Gynecol.* 90: 117-124 (1997).

Kim, Y. M., Romero R. M. Receptores 4: A Potential link between "Danger Signals", the innate immune system, and preeclampsia?. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 193: 921-928 (2005).

Kumazaki K., Nakayama M., Yanagihara M.D., Suehara N., Wada Yoshinao. Immunohistochemical distribution of Toll-like receptor 4 in term and preterm human placentas from normal and complicated pregnancy including chorioamnionitis. *Hum. Pathol.* 35: 47-54. (2004).

Lamaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.,-M., Hoffmann, J. A. The dorsoventral regulatory gene cassette *spzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86: 973-983 (1996).

Latz E., Schoenemeyer A., Visintin A., Fitzgerald K. A. Monks B. G., Knetter C. F., Lien E., Nisel N.j., Espevik T., Golenbock D.T. TLR9 signals after translocation from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nature Immunology.* 5 (2): 190-198 (2004).

Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Immunol.* 1: 135-145 (2001).

Nakatzuka M., Asagiri K., Noguchi S., Habara T., Kudo T. Nafamostat mesilate, a serine protease inhibitor, suppresses Lipopolysaccharide-induced nitric oxide

synthesis and apoptosis in culture human trophoblasts. *Life Science*. 67: 1243-1250 (2000).

Ogata H., Miyake K. The Toll-like receptor protein RP105 regulates lipopolysaccharide signaling in B cell. *J. Exp. Med.* 192: 23-29 (2000).

Okamura Y., Watari M., Jerud E.S., Young D.W. Ishizaka S.T. Rose J., Chow J.C., Strauss J.F. The extra domain A of fibronectin activates toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* 276: 10229-0233 (2001).

Rock F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A., Bazan, J. F. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 588-593 (1998).

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

Svinarich D.M., Bitonti O.M., Araneda H., Romero R., Gonik B. Induction and postranslational expresión of G-CSF and RANTES in a first trimester trophoblast cell line by lipopolysaccharide. *Am. J. Reprod. Immunol.* 36: 256-259 (1996).

Takeda K., Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Inter. Immunol.* 17 (1): 1-14 (2005).

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

Vabulas R.M. Ahmad-Nejad P., Da costa C., Miethke T., Kirschning C.J., Hacker H., Wagner N. Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signalling pathway in innate immune cells. *J. Biol. Chem.* 276: 31332-31339 (2001).

Vizi E.S., Szevenyi J. Selmeczy Z.S., Papp Z., Nemeth Z.H., Hasko G. Enhanced tumor necrosis factor-alpha-specific and decreased interleukin-10-specific immune responses to LPS during the third trimester of pregnancy in mice. *J. Endocrinol.* 171: 355- 361 (2001).

Wetzler Lee M. The role of Toll-like receptor 2 in microbial disease and immunity. *21(2): S55-S60* (2003).

Wright S.D., Ramos R.A., Tobias P.S., Ulevitch R.J., Mathison J.C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science.* 294:1431-1433 (1990).

Zhang D., Zhang G., Hayden M.S., Greenblatt M. B., Bussey C. Flavel R. A., Ghosh S. A Toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303:1522-1525 (2004).