

01421
299



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

RECEPTORES TLR Y SU FUNCIÓN EN EL PARODONTO.

T E S I S A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANA DENTISTA

P R E S E N T A :

CIELO DEL CARMEN RUIZ LÓPEZ .

DIRECTORA: DRA. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS.



MÉXICO D. F.

2003

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1



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.

JURADO ASIGNADO.

PRESIDENTE: C.D. LUZ DEL CARMEN GONZÁLEZ GÁRCÍA.

VOCAL: DRA. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS.

SECRETARIO: C.D. SILVIA MALDONADO FRÍAS.

SUPLENTE: C.D. CARLA PORTILLO GARCÉS.

SUPLENTE: BIOL. HÉCTOR GONZÁLEZ AGUILAR.

**LABORATORIO DE BIOQUÍMICA
POSTGRADO DE ODONTOLÓGIA**

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

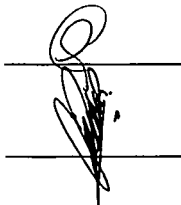
DIRECTORA DE LA TESIS:

DRA. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS.



SUSTENTANTE:

CIELO DEL CARMEN RUÍZ LÓPEZ.



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas que me oriento y apoyo en la realización de este trabajo.

A todos mis profesores de la Facultad de Odontología que me brindaron sus conocimientos y contribuyeron a mi formación académica y realización profesional.

Al personal de la biblioteca del Instituto de Fisiología Celular por brindarme las facilidades para obtener información y completar esta investigación.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

DEDICATORIAS.

A mis padres Fernando y Rafaela que me mostraron el camino a la verdad a través de su apoyo y sus consejos de los cuales he forjado mis principios y elegido mi profesión. Gracias por su amor.

A mis hermanas Norma y Montserrath, así como a mis tíos y abuelos que me acompañan en todos los momentos de mi vida.

A mis amigos y amigas de la generación 98-2002 de la Facultad de Odontología de la U.N.A.M. por haber compartido los momentos de cansancio pero más aún por la alegría de haber realizado nuestras metas.

A mis amigos y amigas que aunque el tiempo y la distancia nos separe siempre estarán presentes en estos momentos de mi vida. Gracias por su amistad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE DE CAPÍTULOS.

Título.	Pag.
Introducción.	1
Justificación.	6
Objetivos.	7
1. Sistema inmunológico.	8
1.1. Activación de la inmunidad adaptativa.	8
1.2. Inmunidad innata y receptores de reconocimiento patógeno	9
1.3. Defensa del huésped en <i>Drosophila</i> y mamíferos.	11
1.4. ¿Cómo se involucran los TLRs en la defensa del huésped?	14
1.5. TLRs expresión y regulación.	18
2. Estructura de los receptores Toll.	21
2.1. Dominio extracelular.	21
2.2. Dominio citoplasmático.	24
2.3. Receptor Toll de <i>Drosophila</i> (dToll).	26
2.4. TLRs en mamíferos.	28
3. Familia TLR, rutas de señalización.	35
3.1. La ruta dependiente de MyD88 es esencial para la respuesta inflamatoria.	35
3.2. Significado biológico de la ruta independiente de MyD88.	36
3.3. Bases moleculares para la ruta independiente de MyD88.	37
3.4. Como reconocen los TLRs sus ligandos.	40
3.5. Reconocimiento patógeno de la familia TLR.	42
3.6. Lipopolisacárido (LPS) y TLR4.	43
3.7. TLR2 es esencial para el reconocimiento de lipoproteínas y 45 peptidoglicanos.	
3.8. ¿Cómo puede reconocer TLR2 una amplia variedad de PAMPs?	46

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Figura 14.** Localización cromosomal de TAK. 65
- Figura 15.** Localización cromosomal de PGLYRP. 67
- Figura 16.** Modelo hipotético de la señal de LPS vía CD14 y TLR-4 en 70 fibroblastos gingivales.
- Figura 17.** Efectos de los anticuerpos monoclonales anti CD14 y anti 72 TLR-4.

ÍNDICE DE TABLAS.

Título.	Pag.
Tabla I. Características de la familia de receptores TLR.	31
Tabla II. TLRs y sus ligandos.	41
Tabla III. Actuales miembros de las superfamilias de receptor TNF/IL-1R/TLR.	63
Tabla IV. Funciones de los TRAFs.	64

ÍNDICE DE FIGURAS.

Título.	Pag.
Fig. 1. Representación esquemática de las rutas homólogas de los factores de resistencia de la planta /dToll/ hToll/ IL-1R.	13
Fig 2. Células Dendríticas y su función en la inmunidad innata.	15
Fig 3. Activación de la inmunidad adaptativa a través de los TLR.	17
Fig.4. Estructura molecular de la región rica en leucina (LRR).	21
Fig. 5. Representación esquemática de PAMPs.	24
Figura 6. Estructura molecular del dominio citoplasmático de TLR/IL-1/IL-12.	25
Figura 7. TLR-4 y TLR9 pueden ejercer efectos biológicos similares a través de distintas rutas de señales.	29
Figura 8. Activación de TLR-4 por LPS de <i>P.gingivalis</i> .	38
Figura 9. Estructura química del lipopolisacárido.	43
Figura 10. Localización cromosomal de MyD88.	54
Figura 11. Localización cromosomal de IRAK.	60
Figura 12. Estructura molecular de IRAK.	61
Figura 13. Localización cromosomal de TRAF.	62

3.9. TLR6 participa en la discriminación de lipoproteínas.	47
3.10. CpG DNA y TLR9.	48
3.11. Flagelina y TLR5.	50
3.12. Ligandos adicionales para TLRs.	51
3.13. RNA Doble hélice (dsARN)	51
3.14. Moléculas tipo No-PAMP para receptores TLR4.	52
4. Transductores.	54
4.1. MyD88.	54
4.2. MyD88 en las respuestas mediadas por TLR/IL-1R.	57
4.3. Ruta de señalización de MyD88.	59
4.4. MAL.	59
4.5. IRAK-4.	60
4.6. TRAF.	62
4.7. Funciones biológicas específicas de los TRAFs de los mamíferos.	64
4.8. TAK.	65
4.9. PGLYRP. Proteína de reconocimiento a peptidoglicano.	67
5. Aplicaciones clínicas de receptores TLR.	68
5.1. La defensa innata del periodonto.	68
5.2. Endotoxinas bacterianas. Lipopolisacárido.	69
5.3. Fibroblastos gingivales como células inmunocompetentes.	71
5.4. Receptores de LPS en fibroblastos gingivales.	71
5.5. La ruta de LPS de <i>P. Gingivalis</i> vía TLR-4	73
5.6. Una opción para el tratamiento de la enfermedad periodontal.	74
6. Conclusiones.	75
7. Anexos. Artículo "Receptores Toll y mecansimos de Transducción en la inmunidad innata ".	76
8. Abreviaturas.	77
9. Bibliografía.	78

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN.

Por décadas las investigaciones han identificado respuestas inmunológicas ante los microorganismos de las biopelículas supragingival y subgingival en la cavidad oral. La inflamación y la destrucción del tejido del periodonto, se produce por los mecanismos de interacción entre los diferentes tipos celulares del periodonto y las bacterias; en este proceso el evento inicial es el reconocimiento a través de receptores ubicados en la superficie celular y el procesamiento de ésta interacción mediante la activación de vías de transducción.

La membrana plasmática separa a la célula del medio que la rodea, es permeable a pequeñas moléculas solubles en lípidos, como las hormonas esteroideas e impermeable a materiales que son solubles en agua, como iones, pequeñas moléculas inorgánicas y polipéptidos o proteínas. El reconocimiento de moléculas hidrofílicas depende de un componente proteínico ubicado en la membrana plasmática de las células. Cuando la molécula extracelular es reconocida por la célula se le denomina ligando y a la proteína de la membrana plasmática que la une se llama receptor.

Las proteínas integrales de la membrana funcionan como un medio de comunicación entre el medio extracelular y el citoplasma. Estas incluyen canales iónicos, transportadores y receptores. Todas estas proteínas se encuentran en la membrana plasmática, por este motivo deberán contener dominios hidrofóbicos. La región transmembranal consta de una hélice- α compuesta de 2-26 aminoácidos hidrofóbicos. Una proteína que tiene dominio expuestos en ambos lados de la membrana se denomina "proteína transmembranal" y la longitud del extremo amino terminal (N-terminal) o del carboxilo terminal (C-terminal) que cruzan la membrana varía desde una dimensión insignificante a una bastante voluminosa.

Las proteínas con un único dominio transmembranal se dividen en dos clases: las proteínas del grupo I en las que el extremo N-terminal se orienta hacia el

espacio extracelular son más comunes que las proteínas del grupo II en las que la orientación se invierte de manera que el extremo amino terminal se orienta hacia el citoplasma.

Los receptores son generalmente proteínas de tipo I, con un único dominio transmembranal, que consiste exclusivamente en aminoácidos no cargados y que conectan los dominios extracelular y citosólico. Muchos de los receptores para factores de crecimiento presentan actividad de tirosina-cinasa. Estos tienen un sitio de unión para su ligando en el dominio extracelular y una actividad cinasa en su dominio citoplasmático. Cuando un ligando se une a su receptor, obliga a la dimerización del dominio extracelular; la mayoría de las veces el producto es un homodímero, pero hay algunos casos en los que se forman heterodímeros. La dimerización de los dominios extracelulares es la causa de que los dominios transmembranales entren en contacto con los dominios citoplasmáticos. Esto da lugar a una autofosforilación en la que cada subunidad monomérica fosforila a la otra.

La transmisión de una señal, implica la interacción de un ligando extracelular con una proteína transmembranal con dominios a ambos lados de la membrana. La unión del ligando convierte al receptor en su forma activa. El principio básico es que la unión con el ligando en la cara extracelular influye en la actividad del dominio citoplasmático. Este proceso es llamado transducción de la señal; debido a que una señal se ha transducido a través de la membrana. La transducción de la señal proporciona un medio de amplificación de la señal original.

El principio de la transducción de señales es que el receptor en su forma activa envía una actividad catalítica en el citoplasma. La señal citosólica puede activar directamente una serie de proteínas o puede incrementar la cantidad de una molécula pequeña dentro de la célula. Una molécula sintetizada en respuesta a la transducción de una señal extracelular se denomina segundo mensajero (el primer mensajero es el ligando extracelular).

El receptor tiene una actividad proteína cinasa en su dominio citosólico. Esta cinasa se activa cuando el ligando se une al dominio extracelular. Hay muchos tipos de proteínas cinasas, que aunque estructuralmente son diferentes entre sí comparten la transferencia de un grupo fosfato a otras proteínas, proveniente de la hidrólisis del ATP. Existen dos tipos de proteínas cinasas que de acuerdo a su localización se encuentran en las membranas o en el citoplasma. Otra clasificación se produce por el tipo de aminoácido de fosforilan y que se clasifican en: Proteínas tirosina cinasa, proteínas serina-treonina cinasa y proteínas con especificidad dual.

La cinasa fosforila su propio dominio intracitoplasmático, esta autofosforilación permite que el receptor se asocie y active una proteína diana, la cual actúa sobre nuevos sustratos en el interior de la célula. Los receptores cinasa más comunes son los que presentan actividad de tirosina cinasa.

La autofosforilación tiene dos consecuencias: primero, la fosforilación en la región cinasa estimula la actividad catalítica, segundo, la fosforilación de residuos tirosina en cualquier otro sitio en el dominio citoplasmático proporciona la manera de transferir la señal al siguiente componente en la vía. La existencia de tirosina fosforilada obliga al dominio citoplásmico a asociarse con su proteína diana. La proteína puede ser diana que se activa mediante su asociación con su receptor, pero no se fosforila *per se*. Si la señal diana causa la activación de una enzima (en la mayoría de los casos), la vía continúa amplificándose. Las dianas pueden ser moléculas adaptadoras que no tienen actividad catalítica o pueden ser enzimas que se activan uniéndose al receptor. Si la proteína es un sustrato de la enzima se fosforila. Si el sustrato es en sí una enzima podría ser activada por la fosforilación. A veces el sustrato es una cinasa y la vía se continúa por una cascada de cinasas que sucesivamente se activan unas a otras. Algunos sustratos son dianas finales, como proteínas del citoesqueleto, cuya fosforilación cambia sus propiedades y genera el ensamblaje de una nueva estructura.

La asociación de esas moléculas de señalización con los receptores es mediada por dominios proteicos que se unen a péptidos que contienen fosfotirosinas específicas. Los dominios se llaman SH2 y SH3. Los dominios SH2 fueron los primeros reconocidos en cinasas tirosina relacionadas a Src, la proteína oncogena del virus sarcoma Rous; el dominio SH2 es una región de aproximadamente 100 aminoácidos y se unen a secuencias de péptidos específicos de residuos de fosfotirosina. El sitio diana se llama sitio de unión de SH2. La activación de un receptor con actividad de tirosina cinasa provoca una autofosforilación de un sitio en la región citoplasmática. La fosforilación convierte al sitio en un sitio de unión de SH2, entonces una proteína con el correspondiente dominio SH2 se une al receptor. El sitio de unión tiene fosfotirosina con 3 a 5 aminoácidos en su zona carboxilo terminal. Algunas proteínas poseen múltiples dominios SH2 incrementando su afinidad para unirse a fosfoproteínas o les confiere la capacidad para unirse a fosfoproteínas diferentes. Un adaptador usa generalmente su dominio SH2 para unirse al receptor y utiliza un dominio SH3 para unir al siguiente componente de la vía.

El gen Toll de *Drosophila* fue el primero en describirse en el contexto de una ruta que ordena el desarrollo dorsal-ventral en el embrión de *Drosophila*. El descubrimiento del vínculo entre esta ruta embrionaria y la inmunidad innata en mamíferos muestra las rutas conservadas entre insectos y mamíferos. La similitud entre la ruta dorsal-ventral en *Drosophila* y la ruta NF- κ B en animales conduce al entendimiento de que la ruta de Toll tiene respuestas antifúngicas específicas en el desarrollo tardío de las etapas de este insecto. Existe una gran homología entre los dominios citoplasmáticos de dos proteínas transmembranales, llamadas *Drosophila* Toll e IL-1RI (receptor a interleucina 1) de mamífero, esas observaciones vinculan las rutas de transducción de señal entre *Drosophila* y los mamíferos, lo que permitió el descubrimiento de TLR humano (llamado ahora TLR4). La unión de TLR4 con su ligando induce la activación de NF- κ B, con la consecuente liberación de citoquinas y la inducción

de moléculas coestimuladoras en macrófagos que asisten la activación de células T.

Se han identificado 10 genes en mamíferos que codifican moléculas TLR. Los TLR (receptores semejantes a Toll), son proteínas de membrana tipo I, el dominio extracelular de TLR contiene una región rica en leucina (LRR). Todos los TLR tienen un solo dominio transmembranal y un dominio citoplasmático involucrado en la transducción de señales. Este dominio citoplasmático es llamado dominio TIR por su homología con IL-1RI.

Los TLR son las moléculas responsables del reconocimiento de bacterias, y hongos su activación conduce a la inducción de péptidos antimicrobiales que ayudan en la eliminación del agente invasor, por lo tanto TLR juegan un papel importante en la inmunidad innata ante los patógenos antimicrobiales.

JUSTIFICACIÓN.

Con el desarrollo de la investigación en el campo de los procesos infecciosos, se ha empezado a obtener información sobre los mecanismos moleculares que mantienen los organismos cuando interactúan con diversos parásitos. Lo que ha permitido comprender la homeostasis de esta interacción y abordar en que condiciones se rompe este equilibrio lo que conduce al desarrollo de la enfermedad.

Este campo de investigación es de gran importancia en la práctica odontológica porque dos de los padecimientos más importantes en la cavidad oral son ocasionados por microorganismos uno de ellos es la caries en donde productos liberados por estos microorganismos conducen a la desmineralización del esmalte que de no atacarse a tiempo conduciría a la destrucción de las piezas dentales. Por otra parte los microorganismos pueden colonizar los bordes internos de la encía para desarrollar la placa subgingival, el control inadecuado de esta placa con lleva al desarrollo en fases iniciales de la gingivitis y en estados avanzados a la periodontitis.

La comprensión de la interacción molecular de estos microorganismos con los tejidos del huésped permitirá sin duda alguna el desarrollo de fármacos que conduzcan a evitar el desarrollo de esta enfermedad.

En fechas recientes se descubrió una proteína a la que se le denominó proteína semejante a Toll, que actúa como un receptor para componentes de diversas bacterias. Por este motivo se realizó el presente trabajo de investigación acerca de la estructura, función y transducción de señales de los receptores parecidos a Toll (TLRs) para conocer de que forma actúan y como están implicados en la enfermedad periodontal.

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

- Realizar una revisión bibliográfica sobre los Receptores parecidos a Toll (TLRs).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Se revisará la estructura de los TLRs.
- Se estudiará el funcionamiento de los TLRs.
- Se revisará el mecanismo de transducción activado por estos TLRs.
- Se estudiará el papel de estos receptores en la enfermedad periodontal.

1. SISTEMA INMUNOLÓGICO.

El sistema inmunológico se divide en inmunidad innata e inmunidad adaptativa. La inmunidad adaptativa es un sistema altamente sofisticado mediado por células T y células B antígeno-específicas. Los mecanismos de defensa con mayor capacidad de discriminación y especialización que constituyen la inmunidad específica o adaptativa se encuentran en los vertebrados. La inmunidad innata es conservada de invertebrados a vertebrados; en los invertebrados la inmunidad innata es un sistema de defensa muy efectiva. El mecanismo de reconocimiento de lo no propio (antígeno) por la inmunidad adaptativa ha sido ampliamente investigada y sus mecanismos principales han sido clarificados, sin embargo el mecanismo de la inmunidad innata para reconocer lo no propio aún no está claro (1).

1.1. Activación de la inmunidad adaptativa.

La respuesta inmunológica adaptativa es un componente crítico de defensa del huésped ante diferentes patógenos. Las características de la inmunidad adaptativa son la expansión clonal de linfocitos en respuesta a un antígeno en particular y la habilidad de formar una memoria inmunológica. En el sistema inmunológico adaptativo los receptores específicos de células T y B para cada replica de células responden a un antígeno específico. Cada receptor clonal en las células B y T son estructuralmente únicos y no son codificados en la línea germinal. Un receptor clonal no está diseñado para reconocer algún antígeno en particular. Estos receptores antígeno-específicos no pasan a la siguiente generación y por lo tanto tienen que ser estabilizados en cada generación. Este proceso es inadecuado para la protección del paciente joven. Primero hay un retraso de una semana para la respuesta primaria o varios días antes de que

una respuesta adaptativa tenga efecto. La capacidad del paciente para limitar la infección antes de que se desarrolle la inmunidad adaptativa es una cuestión de vida o de muerte antes de la introducción de inmunizaciones y antibióticos. Otra cuestión es que el número límite virtual de receptores de antígenos es el resultado de los mecanismos genéticos que podrían ser potencialmente capaces de reaccionar no sólo ante microorganismos infecciosos sino también con varios antígenos ambientales o antígenos propios. Esto podría conducir a alergias o enfermedades autoinmunes (2).

1.2. Inmunidad innata y receptores de reconocimiento patógeno (PRR) y moléculas.

La inmunidad innata juega un papel principal en la defensa aguda del paciente. Esto contribuye críticamente a la destrucción del patógeno, determinando la localización y la extensión del estímulo y la facilitación de la respuesta inmunológica adaptativa. La inmunidad innata o la primera línea de defensa, limita el estímulo infeccioso durante el periodo requerido para que se desarrolle la inmunidad adaptativa. El componente innato para el reconocimiento inmunológico esta basado en un sistema de reconocimiento codificado en una línea germinal. Los receptores de reconocimiento de patrones y moléculas reconocen de forma selectiva a estructuras derivadas de membranas en microorganismos patógenos. Estos últimos incluyen entre otros, LPS (lipopolisacárido) de la pared celular de bacterias gram-negativas, peptidoglucanos, ácidos lipoteicoicos, teicoicos de bacterias gram-positivas, lipoarabinomananos de *Mycobacteria tuberculosis*, mananos de levaduras, zymozan de hongos y las proteínas de la superficie de los virus.

El número total de receptores involucrados en el reconocimiento innato de antígenos es limitado a aproximadamente 100 unidades. Sin embargo los microbios son extremadamente heterogéneos debido a que tienen muchas

mutaciones. La respuesta del sistema inmunológico innato se enfoca a la conservación y la presentación de estructuras esenciales en muchos tipos de microorganismos.

La ausencia de marcadores en la superficie de las células del huésped constituyen la base para la propia discriminación. Esto requiere la interacción receptor-ligando entre las moléculas de reconocimiento del huésped y los patrones moleculares específicos del microorganismo (2). Aunque ciertos eventos post-receptor como la amplificación de señales y la diferenciación de células inflamatorias, así como muchas de las funciones de defensa del huésped son activadas instantáneamente (3,4). La expresión de los receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) no es clonal y un determinado receptor expresado por un tipo de célula tiene una especificidad definida a un cierto grupo de microbios. Los receptores del sistema inmunológico innato son preferencialmente expresados en los monocitos, macrófagos, células dendríticas, células B y otros tipos celulares que no son considerados tradicionalmente en la defensa del huésped.

Estructuralmente los receptores de reconocimiento de patógenos tienen dominios LRR, dominios lectina dependiente de calcio o dominios de receptores scavenger (4). Funcionalmente los receptores de reconocimiento de patógenos se han dividido en 3 clases de acuerdo a su función: de secreción, endocitosis o de moléculas de señales.

El receptor de secreción mejor caracterizado es MBL, un miembro del grupo de lectina que contiene colágena o familia colectina que incluye SP-A, SP-D y otros, tipos de MBL que son sintetizados en el hígado y secretados en el suero como un componente de respuesta en la fase aguda. MBL reconoce y se une a los carbohidratos de las bacterias gram-positivas y gram-negativas, levaduras y algunos otros microorganismos. Esto permite la activación de proteasas y la consecuente activación de la cascada del complemento por un mecanismo que no requiere del complejo antígeno-anticuerpo.

Los PRR endocíticos se encuentran en la superficie de los fagocitos. Esos receptores reconocen los componentes moleculares de patógenos y por lo tanto trasladan a los patógenos en lisosomas intracelulares de macrófagos, donde son destruidos. Los componentes de los patógenos pueden ser procesados y presentados por las moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor en la superficie del macrófago. El receptor manosa del macrófago y el receptor Scavenger del macrófago son entre otros los receptores de reconocimiento patógeno identificados hasta ahora.

Los receptores de señales reconocen los patógenos e inducen la expresión de productos activos de fase aguda, incluyendo las citoquinas inflamatorias. Los receptores para esas moléculas están presentes en una variedad de células inflamatorias y somáticas y son capaces de inducir mediadores involucrados en la defensa aguda del paciente (síntesis y secreción de citoquinas). Algunas de las moléculas inducidas influyen en la presentación del antígeno a las células clonales inmunocompetentes. Células epiteliales, macrófagos, células asesinas, células presentadoras de antígeno son la línea prominente de la superficie de la mucosa y expresan receptores de reconocimiento a patógeno. Un largo y elusivo problema ha sido la falta de conocimiento de los receptores de señales que median la cascada de la inflamación (5).

1.3. Defensa del huésped en *Drosophila* y mamíferos.

Las funciones de los macrófagos, células dendríticas y neutrófilos consisten en el rápido reconocimiento de diversos patógenos así como la respuesta antimicrobiana.

El investigador Janeway pronosticó que las células inmunológicas innatas expresan receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) y que además poseen una alta especificidad para reconocer estructuras moleculares conservadas (PAMPs) (6). *Drosophila* no posee un sistema de inmunidad

adaptativa sin embargo es capaz de mostrar una respuesta efectiva contra la invasión de microorganismos. Las proteínas Toll presentes en la mosca *Drosophila* son las responsables del reconocimiento de bacterias y hongos y de la inducción de péptidos antimicrobianos, una vez que han sido reconocidas responden a las macromoléculas microbiales a través de las señales intracelulares mediante la activación de la cinasa asociada al receptor de interleucina 1 (IRAK) y NF- κ B. Las proteínas Toll fueron descubiertas en 1980 por C. Nüsslein-Volhard y K. Anderson y están implicadas en el establecimiento del eje dorso-ventral en la embriogénesis de *Drosophila* (7).

En la mitad de la década de los 90 se identificó la primera proteína en humanos que es estructuralmente muy similar al receptor Toll de *Drosophila* a esta proteína se le llamó TLR. En 1997 Janeway y su grupo caracterizaron otro Toll-like en mamífero (TLR4 humano) y fue el primero implicado en esta función de la respuesta inmunológica, a la fecha se han caracterizado 10 proteínas transmembranales en células humanas que han mostrado pertenecer a la familia de TLR en mamíferos.

Toll y proteínas de la familia TLR se caracterizan por la presencia de dominios extracelulares con una repetición rica en leucina (LRR) y regiones intracitoplasmáticas llamadas receptor Toll/interleucina-1 (IL-1R), homólogo al dominio (TIR), así designado por su similitud a IL-1R e IL-18R. Los dominios TIR para ambos el Toll de *Drosophila* y TLR en mamíferos, son homólogos y activan componentes intracelulares similares. Por ejemplo, la familia TLR puede activar el factor nuclear (NF)- κ B a través de la degradación de I κ B. Toll también puede llevar a cabo la activación de la familia homóloga de NF- κ B, Dif, mediante la degradación del homólogo de I κ B, designado Cactus. Entonces Toll y familias de TLR son un sistema filogenéticamente conservado para la defensa del huésped (figura 1).

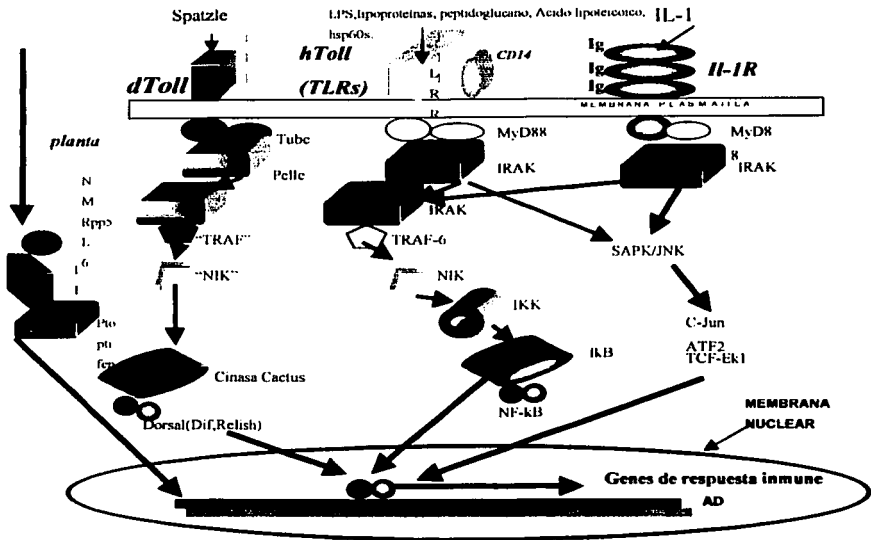


Figura 1. Representación esquemática de las rutas homólogas de los factores de resistencia de la planta/dToll/hToll/IL-1R. Abreviaturas: ATF2, factor2 de transcripción activada; fen, pti,pto, elementos representativos de la cascada de transducción de señal de resistencia en plantas; IKK, cinasa de I-κB; IL-1β, interleucina-1β; IRAK cinasa asociada al receptor de IL-1β; JNK, cinasa NH2 terminal de jun; L6, M, N, Rpp5, receptores homólogos a Toll/IL-1 en plantas; LRR, repetición rica de leucina, NK-κB, factor nuclear-κB; NIK, cinasa inductora deNF-κB; SAPK, proteína cinasa activada por estres; TCF/EIk1, factor complejo teARNry, TRAF6, factor asociado al receptor de TNF tipo 6.

Drosophila puede defenderse contra los microorganismos por la producción de proteínas antimicrobiales. Un tipo de proteína transmembranal, Toll, que juega

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

un papel crítico en la defensa antifúngica, es la molécula 18-Wheeler la cual es estructuralmente similar a Toll, esta proteína participa en la defensa antibacteriana. En la infección, Toll y 18- Wheeler inducen la producción de proteínas antimicrobiales tales como drosomycina y atacina, respectivamente. Recientemente la secuencia del genoma de *Drosophila* ha revelado la existencia de 9 proteínas que pertenecen a la familia Toll. Aunque las funciones de todos los integrantes de la familia no han sido clarificadas, se asume que cada uno está involucrado en la respuesta inmunológica contra los patógenos.

1.4. ¿Cómo se involucran los TLR en la defensa del huésped?

Los TLRs están involucrados en el reconocimiento de los patógenos distinguiéndolos de muchos componentes que no están presentes en el huésped y que se conocen como patrones moleculares de patogenicidad específica (PAMPs).

En la infección, los macrófagos reconocen esos patrones como no propios a través de los receptores similares a Toll (TLRs). Las señales de TLR estimulan a los macrófagos lo que conduce a la inducción de citoquinas proinflamatorias y pequeñas moléculas antimicrobiales como óxido nítrico que sirve para eliminar microorganismos durante la fase temprana de la infección.

Sin embargo la activación de la respuesta inmunológica innata en tejidos periféricos tiene una limitación para erradicar a los patógenos en los mamíferos. La defensa más efectiva del huésped es llevada a cabo con la activación de la respuesta inmunológica adaptativa, la cual principalmente se lleva a cabo en los tejidos linfoides secundarios como los linfonodos.

Las células dendríticas (CDs) juegan un papel esencial en la respuesta inmunológica ya que participan en la comunicación entre los tejidos periféricos y linfoides y actúan como células presentadoras de antígeno (APCs) (8). Las

células dendríticas inmaduras se localizan en los tejidos periféricos, no linfoides como la piel y poseen una gran capacidad para la endocitosis. Estas células constituyen una población única capaz de activar células T. Las células dendríticas son importantes para la sensibilidad en la invasión patógena y para enviar instrucciones al sistema inmunológico adaptativo. Para que se produzca la activación de las células T, es necesario que las células dendríticas dejen los tejidos periféricos y migren a los linfonodos (maduran y pierden la capacidad de endocitosis). Este desplazamiento de CD es mediado por receptores de quimocinas que son expresados en CDs seguido por la estimulación de TLR (figura 2).

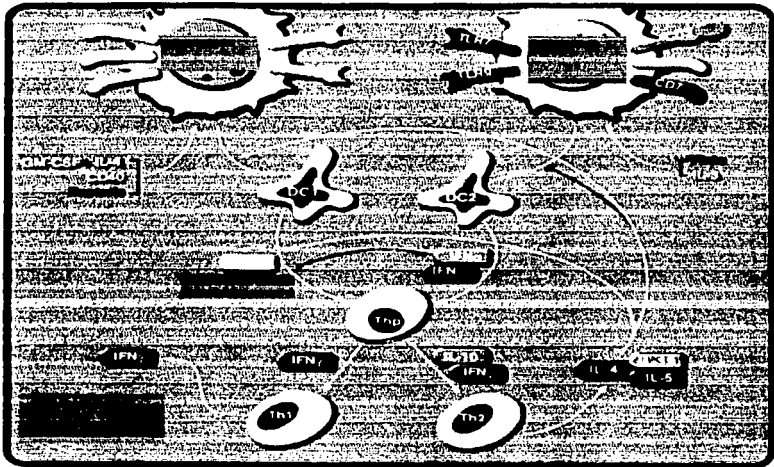


Figura 2. Celulas dendríticas (CDs) y su función en la inmunidad innata.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El estímulo bacterial puede inducir a las CD4s a liberar citoquinas tales como factor de necrosis tumoral α (TNF- α) o interleucina 12 (IL-12), esta última es importante para la diferenciación de células T en Th1. La capacidad de inducción de citoquinas que depende del tipo de estímulo o subgrupos de CD4s. Por ejemplo, las secuencias CpG DNA pueden estimular a las CD4s a producir más IL-12 que cuando se estimulan con LPS aunque ambos estímulos poseen la habilidad de inducir Th1. Esos estímulos inducen la sobreexpresión de moléculas coestimuladoras en CD4s incluyendo CD40, CD80 y CD86. Este paso llamado maduración de CD4s es crucial para activar las células T. Los LPS pueden disminuir la expresión de receptores de quimiocinas tales como CCR5, pero también pueden participar en sobreexpresar la expresión de CCR7. Las CD4s también pueden producir una variedad de quimiocinas que reclutan células asesinas naturales y células T.

Los TLR estimulan la maduración de CD4s las cuales migran a los linfonodos donde estimulan a las células T para la presentación del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). La presentación del antígeno solo puede estimular la duplicación de células T que actúan contra patógenos específicos, pero no es suficiente para desencadenar la eficiente expansión de células T (figura 3).

La duplicación de células T requiere una señal adicional expresada por moléculas coestimuladoras como CD80/86. Las señales de TLR desencadenan la inmunidad adaptativa incrementando la expresión de moléculas de MHC y la estimulación de esas moléculas en CD4s (9).

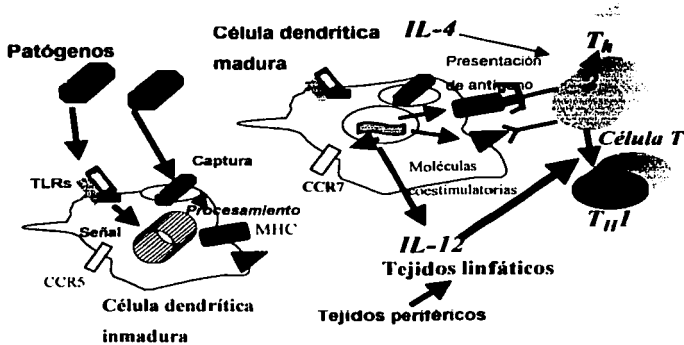


Figura 3. Activación de la inmunidad adaptativa a través de TLRs.

Primero, Las células dendríticas inmaduras en los tejidos periféricos son sensibilizadas por patógenos invasores. Los patógenos son reconocidos por TLRs o capturados por endocitosis. La señal de TLR permite la maduración de las células dendríticas (CDs). Las CDs maduras muestran una baja expresión de CCR5 y una alta expresión de CCR7, el cual puede proveer cooperativamente CDs con la habilidad de salir de los tejidos y migrar dentro de los tejidos linfoides. Simultáneamente, los patógenos capturados son procesados. Los productos procesados son entonces presentados a las células T como complejos antígeno-MHC. Las señales de TLR juegan un papel importante en la activación de células T clonales por el aumento de la expresión de moléculas MHC y moléculas coestimuladoras. Los TLRs pueden también regular la diferenciación de células T mediante la producción de citoquinas proinflamatorias tales como IL-12. IL-12 puede instruir a las células T a diferenciarse en células TH1. En consecuencia, el establecimiento de la inmunidad adaptativa es influenciada por CDs estimuladas por TLR.

La diferenciación de células T es totalmente importante para el establecimiento de la inmunidad adaptativa. Las células T pueden diferenciarse en 2 distintos subgrupos, Th1 y Th2. Las infecciones bacterianas provocan principalmente respuestas de las células TH1, mientras que los alérgenos o los parásitos provocan respuestas de las células Th2. Las células Th1 secretan la citoquina efectora interferon gamma (IFN- γ), que participa en la inmunidad celular. Las células Th2 producen las citoquinas efectoras IL-4, IL-10 e IL-13 involucradas

en la inmunidad humoral. La diferenciación en Th1 o Th2 puede ser dirigida por CD dependiendo del subgrupo de células dendríticas, de la etapa de maduración de CD o de CD en relación a células T. La infección bacteriana activa CD vía estimulación de TLR e induce principalmente Th1 por medio de citoquinas como IL- 12. Por lo tanto CD estimuladoras de TLR se ocupan directamente de la diferenciación de células T hacia Th1, las CD pueden activar la diferenciación de células Th2 por la estimulación de ciertos TLR en la infección por helmintos o ciertos microbios (9).

Los TLR son cruciales no solo en la fase temprana de la infección también en la unión entre la inmunidad innata y la adaptativa. Los TLR están involucrados en múltiples actividades inmunoestimuladoras y se definen como receptores auxiliares en el cuerpo.

TLR1, 2, 4 y 5 son expresados en las CDs inmaduras y sólo TLR3 se expresa en células CDs maduras. Esto implica que TLR3 tienen una función única. La caracterización del funcionamiento de los TLR3 en CDs permitirá establecer una nueva función de los TLRs. Pero aún no queda claro si la fagocitosis precede la activación mediada por TLR de las células de la inmunidad innata. En el caso de los TLR9 el dinucleótido guanosina-fosfato-citosina no metilado de DNA (CpG DNA), encontrado en infecciones por bacterias; podría inducir la activación de las células inmunológicas innatas después de la fagocitosis, por que CpG DNA es reconocido en el endosoma. Por otra parte otros TLRs como TLR1, TLR2 y TLR4 son expresados en la superficie celular, sugiriendo que los productos secretados de manera natural de los patógenos son reconocidos antes de la fagocitosis. La relación entre TLRs y la fagocitosis podría aclarar el mecanismo para desencadenar la activación de la inmunidad innata (10).

1.5. TLRs expresión y regulación.

Numerosos tipos celulares hematopoyéticos y no hematopoyéticos responden a endotoxinas y muchas de estas células expresan TLR4, incluyendo

adipocitos, células epiteliales intestinales, fibroblastos y células endoteliales. Los TLRs inicialmente se localizaron en todos los tejidos linfoides pero en los leucocitos es donde se encuentran más altamente expresados (10). La expresión del ARNm de TLR fue encontrado en monocitos, células B, células dendríticas y células T (11). La sensibilidad de respuesta celular a PAMPs es un factor crítico para confirmar la expresión de los miembros de la familia TLR. Las células B expresan débilmente TLR4 en relación a los macrófagos, que poseen una fuerte sensibilidad a LPS y expresan RP105, que es otro miembro de la familia TLR que coopera con TLR4 para conferir sensibilidad a LPS. La expresión de TLR en células de la línea monocito/macrófago tiene un papel importante en la modulación de la respuesta inflamatoria vía liberación de citoquinas y la expresión de moléculas coestimuladoras. Por lo tanto la expresión de TLR en sitios periféricos (así como en células inmunológicas que migran a ellos), permite a los TLRs servir en el sistema innato en sitios de invasión patógena.

Las células humanas endoteliales microvasculares (HMECs) expresan TLR4 y responden al LPS, pero no expresen TLR2 y por lo que no responden a la lipoproteína de *Micobacterium tuberculosis de 19 kD*.

Las células dendríticas (CDs) son células presentadoras de antígeno, se clasifican en células dendríticas derivadas de monocitos y células dendríticas plasmacitoides. Las células dendríticas derivadas de monocitos (CD1s) expresan TLR2 y TLR4 y la maduración de este subgrupo puede ser inducido por lipoproteínas o LPS. Sin embargo las CD1s no responden a los CpG de ADN no metilados (12, 13). En contraste las CDs plasmacitoides (pCD2s) las cuales producen interferones y expresan TLR9, maduran en la presencia de CpG ADNs, pero no con LPS (14). La expresión y distribución de TLR en esas poblaciones de CD en tejidos linfoides sustenta la hipótesis que el subgrupo CD1 presenta un amplio campo de antígenos para células T.

La regulación de la expresión de TLR2 es sumamente interesante ya que IL-4 actúa en la degradación o down regulation de la expresión de TLR, sugiriendo que las respuestas inmunológicas adaptativas de Th2 inhiben la activación de TLR. Por otra parte, la infección por *Micobacterium avium* causa un incremento en la expresión de TLR2 en macrófagos, pero un decremento en la expresión de TLR4, sugiriendo una regulación diferencial. Las células del epitelio intestinal regulan la expresión de TLR en el lado basolateral de la célula para responder a patógenos tales como *Salmonella*, mientras que se ignora al comensal no invasivo *Escherichia coli*. La regulación de la expresión del gen TLR es de vital importancia para el entendimiento de la diversidad de las respuestas de TLR y de como TLR forma muchos componentes de señales y la sensibilidad que se requiere para la expresión de un TLR en particular.

El fenómeno de tolerancia al LPS es considerado como el resultado de la regulación de la expresión de TLR. En muchos grupos celulares se ha observado un decremento transitorio en los niveles en el mensajero del ácido ribonucleico (ARNm) de TLR4 en la estimulación con LPS. Nomura y colaboradores reportaron (15) que la estimulación de LPS permite el incremento en la expresión de TLR4/MD2 en la superficie celular así como el decremento simultáneo de la producción de citoquinas. Tanto el péptido-glucano como IL-1 β trabajan a través de TLR2 y el receptor de IL-1 respectivamente, pero no afectan la expresión de TLR4/MD2. Sin embargo, la tolerancia cruzada ha sido reportada entre diferentes TLR, por ejemplo la activación de células con LPS provoca una baja sensibilidad a lipoproteínas y viceversa (16). Aunque en algunos casos la tolerancia cruzada puede resultar en el decremento de la expresión de TLR, en otros casos puede ser debido a la formación de componentes de señales.

2. Estructura de los receptores Toll.

2.1. Dominio extracelular.

La superfamilia de proteínas ricas en leucina (LRR) poseen diversas funciones y localización celular y están presentes de una gran variedad organismos. En la familia de pequeños proteoglicanos ricos en leucina (SLRP) de la matrix extracelular, se han encontrado LRR intercaladas en la membrana celular como la familia de Trk de receptores de neurotrofina; anclados a la membrana celular por medio de la unión a GPI, como la proteína conectina en *Drosophila* y en el citoplasma de la célula ejemplo el inhibidor de ribonucleasa (17). El dominio extracelular en los receptores Toll presenta una región rica en leucina (LRR), esta región está conformada por módulos cortos de proteína formados de entre 20 a 29 aminoácidos, que se caracterizan por una porción de residuos hidrofóbicos en las regiones extracelular, membranal y citoplásmica (figura 4).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 4. Estructura molecular de la región rica en leucina (LRR).

Un subgrupo de la superfamilia de LRR colinda con residuos de cisteína, esta organización es una propiedad de proteínas adhesivas y de algunos receptores; entre los que se incluyen a la proteína activadora RP105 presente células B, que es una glucoproteína rica en leucina, así mismo el antígeno oncofetala asociado a la metástasis 5T4, componentes de la glucoproteína en plaqueta denominada complejo I6-V-IX, los receptores toll presentes en *Drosophila* y la familia de TLRs en mamíferos (18).

Muchos miembros de la familia de LRR están involucrados en el proceso de embriogénesis y desarrollo. Toll es un mediador crítico de la embrioventralización de *Drosophila*, esta proteína se caracteriza por presentar dominios LRR y está involucrada en el desarrollo de la glia media y en el desarrollo del sistema nervioso (19).

Recientemente muchos miembros de la familia LRR han sido implicados en el desarrollo y mantenimiento de la región neural en humanos entre los que incluyen a homólogos Slit (19). Por otra parte se ha observado que alteraciones en el patrón de expresión de LRR conduce al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

La función precisa de los LRR no ha sido completamente esclarecida aunque hay algunas evidencias que los asocian al establecimiento del contacto célula-célula y a la interacción con ligandos. La proteína caoptina presente en *Drosophila* está compuesta casi exclusivamente por LRR y se ha caracterizado que funciona como un mediador de la adhesión de células heterotrópicas y en sitios de interacción celular (20,21).

Las moléculas Toll participan en la adhesión celular mediante la modulación de señales extracelulares que conducen a la activación de otras moléculas de adhesión en la superficie celular. Se ha demostrado que mutaciones en el

dominio LRR, particularmente en el sitio que interactúa con la membrana y en la que se encuentran los residuos de cisteína conduce a la activación permanente de estos receptores (21).

La delección completa de la porción extracelular de LRR de los receptores Toll conduce a un aumento de la función de los mismos, lo que sugiere que la activación de señales de transducción de estos receptores está regulada por el dominio extracelular. La cascada de transducción de señales activada por la interacción de un ligando con su receptor Toll también activa el sistema de defensa antimicrobial no específico (22).

En insectos y mamíferos el reconocimiento de los patógenos es mediado por un grupo de receptores denominados receptores de reconocimiento de patógenos (PRR), los PRR identifican estructuras moleculares conservadas (patrones moleculares asociados a patógenos, PAMP), que se encuentran en algunos grupos de microorganismos (23). Figura 5.

Por medio de los receptores PRR las células sintetizan péptidos antimicrobianos y citoquinas efectoras que activan los componentes adicionales del sistema inmunitario del huésped. Este sistema de inmunidad innata también existe en los vertebrados.

Los PRR celulares se localizan en las células efectoras del sistema inmunológico innato, un subgrupo de células que presentan antígenos y estimulan la activación y diferenciación de linfocitos específicos. Por lo tanto una señal recibida e interpretada por un mecanismo de defensa no específico y no clonal es directamente mejorada por la respuesta inmunológica adaptativa.

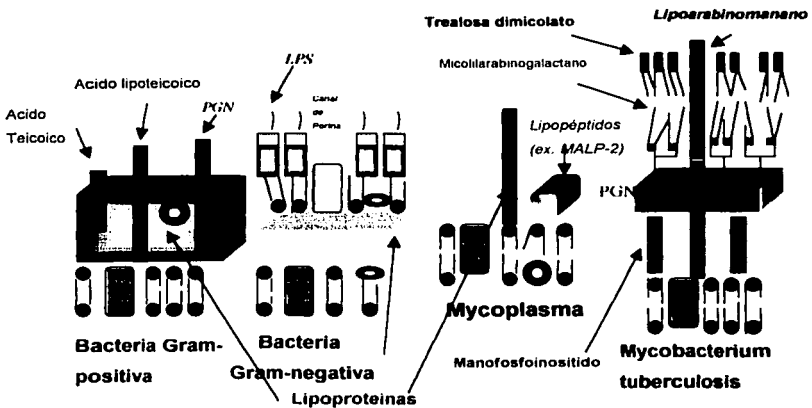


Figura 5. Representación esquemática de PAMPs.

Las bacterias Gram positivas muestran una capa espesa de peptidoglucanos (PGN) en la pared celular. Los ácidos lipoteicoicos, ácidos teicoicos, y lipoproteínas son también incluidas en esta pared celular. Las bacterias Gram negativas tienen una delgada capa de PGN en su pared celular comparadas con las bacterias Gram-positivas. La pared celular de la bacteria Gram-negativa se caracteriza por la presencia de lipopolisacáridos (LPS) en la superficie exteARN. Los LPS constan de un componente activo, la porción del lípido A, y polisacáridos-O (antígeno O). Este último está expuesto fuera de la superficie celular. Las porinas están implicadas en la formación de poros a través de los cuales pasan pequeñas moléculas. En *Mycoplasma* las capas de una pared celular están al exterior pero las lipoproteínas y los lipopéptidos están dentro en su membrana citoplasmática. *Mycobacterium tuberculosis* presenta, una espesa capa hidrofóbica que contiene micoliarabinogalactano y trealosa-dimicolato, en adición a una membrana citoplasmática y una capa de PGN. El lipoarabinomanano es un componente de la pared celular asociado a glucolípidos. Algunos de esos PAMPs muestran una fuerte actividad inmunológica al actuar como ligandos de diferentes miembros de la familia TLR.

2.2. Dominio citoplasmático IL-1R.

Existe una gran homología entre el dominio citoplasmático de los receptores Toll de *Drosophila* y el receptor de interleucina-1 β (IL1 β -R) de mamíferos. Se ha demostrado así mismo que las moléculas que participan en las vías de

transducción de los receptores Toll son similares a las que se utilizan cuando se activa IL1 β -R, por otra parte existen similitudes en los sistemas de defensa de aves, mamíferos y plantas cuando se exponen a diferentes patógenos (24).

Como es bien sabido, IL-1 β es un regulador de las respuestas inflamatoria e inmunológica y tiene efectos en casi todas células del cuerpo. Más de 90 genes están regulados por IL-1 β , incluyendo genes de citoquinas, receptores de citoquinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión, componentes de la matriz celular y moléculas reactivas de la fase aguda de infección (figura 6).



Figura 6. Estructura molecular del dominio citoplasmático de TLR, IL-1 β e IL-18. Dominio receptor Toll-IL-1 (TIR).

Un gran número de investigaciones se han enfocado en la caracterización de la vía de transducción involucrada desde la activación del receptor para IL-1 β hasta la translocación del factor de transcripción NF- κ B, el cual es muy importante en las respuestas inmunológica e inflamatoria.

Se ha caracterizado que el sistema prototípico de IL-1 β R/NF- κ B consta de múltiples intermediarios que culminan en la translocación de NF κ B al núcleo y la subsecuente activación transcripcional de genes efectoras. La ruta de señalización de IL1-R involucra el reclutamiento de la proteína adaptadora

MyD88, la cual une a IRAK e IRAK-2 que son dos cinasas de residuos serina/treonina, estas cinasas posteriormente se asocian y activan a la proteína adaptadora TRAF6, que a su vez se asocia con la proteína cinasa NIK. NIK activa el complejo cinasa I- κ B (IKK- α y β), permitiendo la fosforilación y la degradación de I κ B y la liberación y translocación de NF- κ B (24)

Las señales a través de los receptores Toll de *Drosophila* emplean una cascada complementaria de homólogos de cinasas y factores de transcripción a las que utilizan los mamíferos.

2.3. Receptor Toll de *Drosophila* (dToll).

El gen toll de *Drosophila* codifica para una proteína con características de un receptor que activa vías de transducción. Toll y los genes relacionados a esta proteína tienen muchas funciones en *Drosophila* entre las que se encuentran la estabilidad del eje dorso-ventral durante su desarrollo embrionario, la regulación de la respuesta inmunológica ante el tratamiento con patógenos y otros procesos del ciclo de vida de *Drosophila*, incluyendo el control de la forma del cuerpo y la regulación del desarrollo muscular. Las actividades en la embriogénesis y la respuesta inmunológica son controladas a través de rutas que muestran una gran similitud funcional y estructural con la cascada de señales de transducción de IL-1 β R.

Estudios mutagénicos de IL-1 β R muestran que los aminoácidos esenciales para su funcionamiento se encuentran conservados en la proteína Toll y de igual manera los mediadores de la vía de transducción de Toll, las proteínas Pelle, Cactus y Dorsal son homólogos a IRAK, I κ B y NF κ B de mamíferos.

Una serie de reacciones proteolíticas genera la forma activada de Spätzle, esta molécula funciona como un ligando para el receptor Toll en *Drosophila* tanto en el desarrollo como en inmunidad.

Spätzle es miembro de la superfamilia del grupo de cisteína (similar a los factores de crecimiento de neuronal en humanos) y se cree es activado por diferentes cascadas de cinasas de residuos de serina tanto en la embriogénesis como en la respuesta inmunológica. La activación del receptor Toll también requiere la participación de la proteína intracelular Tube (similar a MyD88), la cual subsecuentemente activa a Pelle una cinasa de residuos serina/treonina. Tube tiene un dominio de muerte (una región involucrada en las interacciones homofílicas proteína-proteína), parecido a MyD88 (requerida para la activación de Toll y Il-1 β R en humanos) que podría tener una función similar. Así como en las interacciones de IRAK/Ik-B/NF-kB, pelle controla la degradación de Cactus la cual está unida a la proteína Dorsal en el citoplasma. La degradación de Cactus permite a Dorsal translocarse al núcleo y regular la transcripción de genes (25,26).

Hay tres genes de *Drosophila* que son homólogos a dToll (dominio intracelular IL-1 β R y LRR extracelular) y que también están implicados en su desarrollo:

18- Wheeler: es requerido para la morfogénesis de *Drosophila* y se considera tiene una función en la adhesión celular y que participa en el movimiento celular.

Receptor TLR de *Drosophila* (receptor Toll-like): que participa en la embriogénesis y en las interacciones célula-célula en límites críticos durante el desarrollo.

Mst-prox: que es el menos caracterizado.

Tanto el receptor Toll de *Drosophila* como 18-Wheeler inducen la expresión de genes que codifican a proteínas antibacterianas y antifúngicas en la respuesta inmunológica de *Drosophila* (26).

Se han encontrado diferentes rutas para las respuestas inmunológicas ante los patógenos, las señales del receptor Toll para el péptido antifúngico,

drosomicina actúan por la ruta previamente descrita para la diferenciación dorsal-ventral (incluyendo el ligando Spätzle) y también está involucrado otro miembro de la familia Rel (Dif o Relish).

Se demostrado que mutaciones en las rutas de las señales de Toll reducen la supervivencia de *Drosophila* adulta después de la infección por hongos. Toll es también requerido en la inducción de proteínas bactericidas como cecropina, atacina y defensina. Por otra parte 18-Wheeler está involucrado en la expresión de atacina, cecropina y diptericina a través de una proteína similar a Rel denominada Dif. Por otra parte mutaciones en el gen 18-Wheeler ocasionan que la larva de *Drosophila* sea más susceptible a la infección de patógenos. Todos estos componentes de la respuesta humoral de *Drosophila* son producidos en el cuerpo graso de este organismo que similar al hígado de los vertebrados.

2.4. TRL en Mamíferos.

Se han descrito 10 distintos TLR en humanos y mamíferos pero se considera que existen muchos más miembros de acuerdo a los análisis de bancos genómicos. Cada TLR tiene una estructura característica: un dominio extracelular o LRR y un dominio IL-1R intracelular (27).

Estas proteínas están involucradas en la respuesta inmunológica innata en humanos, así como en la unión entre los sistemas inmunológicos innato y adaptativo por otra parte se ha demostrado también que intervienen en el proceso de desarrollo en mamíferos (figura 7).

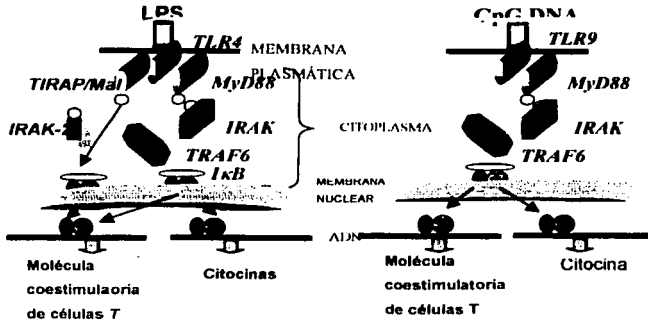


Figura 7. TLR4 y TLR9 pueden ejercer efectos biológicos similares a través de distintas rutas de señales.

Ambos TLR4 y TLR9 pueden activar rutas de señales procedentes de MyD88. Esta ruta de forma secuencial activa a IRAK y TRAF6 y permite la activación de NF-κB y MAPKs (no se muestran). Notablemente, TLR4 pero no TLR9, puede activar NF-κB y MAPKs en una forma independiente de MyD88 y TIRAP/Mal de manera dependiente. La inducción de citoquina en respuesta a los ligandos de TLR4 y TLR9 es completamente dependiente de MyD88. Ambas señales de TLR4 y TLR9 pueden inducir la regulación de moléculas coestimuladoras y la actividad estimuladora de células T. Sin embargo, estos efectos difieren en sus requerimientos para MyD88; esto es, los efectos biológicos de TLR4 son independientes de MyD88 mientras que los efectos de TLR9 son dependientes de MyD88.

Medzhitov (28) fue el primero en demostrar un gen Toll humano al que se le denominó hToll o TLR-4. La transfección de esta proteína puede inducir la activación de NF-κB. NF-κB controla genes para las citoquinas inflamatorias IL-1β, IL-6 y IL-8, así como la expresión de la molécula coestimuladora B7.1, la cual es requerida para la activación de células T. Subsecuentemente se mostró que TLR4 puede activar la transcripción de genes mediadores de la inflamación

a través de NF- κ B y cinasa terminal jun-NH2 (JNK), incluyendo rutas que divergen de TRAF6.

La JNK (cinasa activada por el estrés, SAPK), suministra un mecanismo alternativo para generar factores proinflamatorios a través de TLRs (TLR4, TLR6), IL-1R y TNFR-1 (receptor del factor de necrosis tumoral).

Chaudhary y colaboradores (30) describieron dos Toll humanos TIL3 (TLR5) y TIL4 (TLR2) incluyendo su localización cromosómica y la distribución en los tejidos. Ambas proteínas son capaces de activar NF- κ B pero en un tipo específico de célula. La clonación y caracterización de 5 receptores Toll muestran que TLR1 es homólogo a TIL, TLR2 es homólogo a TIL4, TLR5 es homólogo a TIL3 y TLR4 es homólogo a hToll (31).

TLR6 ha sido recientemente descrito y es muy similar a TLR1 (69% de homología en aminoácidos) con una localización cromosomal similar. La activación de TLR6 induce la translocación de NF- κ B y la activación de la c-Jun NH₂ cinasa terminal (JNK) en un modo similar a TLR4. La distribución en tejidos ha sido demostrada únicamente por RT-PCR, lo que sugiere que estas moléculas tienen un bajo nivel de expresión (Tabla I).

El papel de los receptores Toll en la respuesta de células de insectos y mamíferos ha sido extensamente estudiada. Un mejor entendimiento de como responden los mamíferos a la bacteremia es de gran importancia porque una infección de bacterias gram-positivas, gram-negativas y otros organismos microbianos resulta en aproximadamente en 70,000 muertes por año en los Estados Unidos, cientos de esas muertes pueden ser atribuidas a esos patógenos.

Tabla I Características de la Familia de Receptores TLR				
Receptor	Nombre alterARNtivo	Localización cromosomal	Distribución por tejido	Activación.
TLR1	TIL, rsc 786	4p14	ovario, bazo	
TLR2	TIL4	4q32(4q.3-32[B])	leucocitos, bazo, pulmón, corazón, cerebro, músculo, fibroblastos gingivales	Activa NFkB
TLR3	-----	4q35	leucocitos, bazo, pulmón, corazón, cerebro, músculo	Activa NFkB
TLR4	hToll	9q32-33	leucocitos, corazón y placenta	Activa NFkB y cinasa NH2 terminal de jun
TLR5	TIL3	1q33.3[9](1q41-42[B])	leucocitos, ovarios, próstata, testículos	Activa NFkB
TLR6	-----	4p	limo, bazo, ovario, pulmón	Activa NFkB y cinasa NH2 terminal de jun
TLR7			cerebro y pulmón	
TLR8			corazón, hígado y pulmón	
TLR9			hígado y pulmón	

Dentro de las toxinas presentes en las bacterias gram-negativas se encuentran los lipopolisacáridos (LPS) que requieren de la glucoproteína CD14 y el factor de asociación a LPS (LBP) y/o CD 14 soluble para las señales a través del receptor celular.

Debido a que los receptores Toll están involucrados en respuestas inmunológicas primitivas, los receptores Toll-like fueron los candidatos idóneos como receptores a la respuesta a LPS en mamíferos. Algunos estudios mostraron que las células de riñón no sensibles a LPS responden cuando se transfectan con TLR-2.

Así mismo en células HEK293 son capaces de mostrar un incremento a la sensibilidad a LPS al transfectar estas células tanto con TLR2 como con TLR4. Sin embargo fibroblastos de ovario de ratón que no expresan TLR-2, pero si presentan CD-14 responden al tratamiento con LPS. Por lo que Heine (31) postuló que TLR2 es suficiente pero no necesario para la respuesta de los

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

mamíferos a la endotoxina lo que sugería que TLR4 era el receptor principal en la respuesta a LPS. Esta propuesta se confirmó con la generación de un ratón deficiente en TLR-4 que no respondía al tratamiento con LPS .

Con relación a las infecciones por microorganismos gram-positivos, se ha confirmado que el receptor TLR2 es requerido para la respuesta a peptidoglucanos y ácido lipoteico en células HEK 293. Sin embargo la expresión de TLR1 o TLR4 no da respuestas similares. Además, el efecto en la expresión de TLR2 en células no es bloqueado por polimixina B, proteína que se une e inactiva a LPS. Por otra parte la respuesta a estos componentes de las bacterias gram-positivas involucran también a CD14 (similar a la respuesta a LPS), sin embargo esto no requiere suero como en la respuesta a LPS.

Yoshimura (32) mostró resultados similares en donde la proteína TLR-2 está involucrada cuando se tratan los fibroblastos con *Staphylococcus aureus* y antígenos de *Streptococcus pneumoniae*. Las lipoproteínas y sus derivados son conocidos como potentes activadores inflamatorios de neutrófilos, macrófagos y células B y han sido implicados en la infección crónica.

Las lipoproteínas asociadas con las especies de *Mycobacterium*, incluyendo *Mycobacterium tuberculosis*, son potentes estimuladores de IL-12 en macrófagos. IL-12 es un mediador clave de la respuesta inmune innata y los resultados en la generación de linfocitos T-ayudadores tipo 1, los cuales son requeridos para la eliminación de patógenos intracelulares tales como *M. tuberculosis*. Brightbill mostró que TLR2 se requiere para la activación de monocitos humanos (con producción de IL-12) por lipoproteínas. Underhill mostró que los macrófagos sintetizan TNF- α (importante en la formación de granuloma y en la respuesta del huésped) a través de TLR2 cuando se tratan con tres fracciones estructurales de la pared celular de *M. tuberculosis*. De la misma manera las lipoproteínas de *Borrelia burgdorferi*, el agente causal de la enfermedad de Lyme, han sido identificadas en promover la translocación nuclear de NF- κ B con la producción de citoquina y de óxido nítrico/superóxido (existen resultados similares en respuesta al tratamiento con *Mycobacterium*).

Hirschfield (33) confirmó que TLR2 junto con CD14 incrementan las células del glioma humano U373 que expresan TLR1, TLR3 y TLR4 pero no TLR2. Este último pueden responder vigorosamente a LPS pero no a la lipoproteína OspA de *B. burgdorferi*.

Aunque los estudios demuestran un requerimiento para TLRs en la respuesta a patógenos microbianos, las funciones de cada uno de estos receptores no ha sido completamente caracterizada.

Muchos de los estudios publicados involucran la transfección de líneas celulares para que expresen diferentes TLR, sin embargo esto podría no ser verdadero en procesos vivos. También se ha sugerido que quizá el complejo de señales involucra a un conjunto de proteínas heterodiméricas (i.e. TLR múltiples) similares al complejo IL-1R/IL-1Acp (proteína accesoria de IL-1). Otros mediadores han sido implicados, incluyendo MD-2 (similar a la interacción de MD-1 con el activador de células B RP105) el cuál podría estar involucrado en la señal de LPS a través de TLR4.

La molécula adaptadora celular de TLR/IL-1R es MyD88 la cual es requerida para la respuesta celular tanto de los componentes de paredes celulares de bacterias gram-positivas como gram-negativas. Sin embargo existen reportes que señalan que los receptores TLR4 y TLR9 activados por distintos ligandos comparten la misma vía de transducción. Pero el receptor TLR4 a través de una vía distinta puede inducir el desencadenamiento de la misma respuesta biológica.

Las células efectoras inmunológicas poseen diferentes combinaciones de TLRs y posiblemente diferentes TLR son capaces de proveer un mecanismo para la discriminación patógena. TLR-2 se requiere para la identificación de bacterias gram-positivas y levaduras. TLR4 es necesario para el reconocimiento de las bacterias gram negativas (33). Estas conclusiones se obtuvieron a partir del tratamiento con distintos glucolípidos lipoarabinomanano (LAM) y LPS. La unión a estos ligandos a CD14 no es discriminatoria pero la subsecuente

activación celular se encontró que es específica a TLR. TLR2 es necesario para el reconocimiento y respuesta a LAM y TLR4 para la activación por LPS.

Algunos autores señalan que defectos en la función del receptor Toll han demostrado incrementar la susceptibilidad a la infección en *Drosophila* y ratones. Mencionan así mismo que una posible alteración de TLR en cuanto a su función o expresión juegan un papel importante en la enfermedad humana. La variabilidad en la composición y función del receptor confiere el incremento o decremento de la susceptibilidad a la infección. Por otra parte una mejor comprensión de la cascada de traducción de los TLR podría proporcionar información para nuevas terapias antimicrobiales.

Existen algunos resultados que señala los TLR podrían ser importantes en el desarrollo humano y en el mantenimiento de las funciones normales de los organismos. Por ejemplo miocitos cardiacos normales y disfuncionales expresan diferentes TLR4. En ausencia de la infección el sistema mediador de TLR podría estar involucrado en la fagocitosis de restos de células apoptóticas.

Esos descubrimientos fueron sustentados por un reporte que describe la habilidad de la proteína de choque térmico de corazón humano (Hsp60) para actuar como un ligando endógeno para el complejo TLR4. Hsp60 (34) es usualmente retirado del interior celular donde funciona como una molécula acompañante. Sin embargo Hsp60 es liberada durante un daño celular y necrosis o cuando se transporta a la membrana plasmática durante las respuestas de los diferentes tipos de células. Por lo que se sugiere que Hsp60 funciona a través de TLR para activar la respuesta inflamatoria en el daño celular. Hay evidencias que sugieren que la expresión alterada de TLR o de LRR podrían estar involucradas en la patología cardíaca, en enfermedades neuro-degenerativas o en malignidades. Se ha propuesto que la notable conservación de las rutas de señales de Toll ha sido una presión evolutiva para conservar y adaptar de forma eficiente sistemas que reconozcan y transmitan señales lo que conduce a una rápida respuesta celular.

3. Familia TLR, rutas de señalización.

3.1. La ruta dependiente de MyD88 es esencial para la respuesta inflamatoria.

Los receptores TLR activan las cascadas de transducción de señales primero con la expresión de genes de respuesta inmunológica seguido del reconocimiento de sus respectivos ligandos. El mecanismo de señalización de TLR es bastante similar al de la familia de IL-1 β R, ambas familias de receptores poseen dominios TIR. MyD88, que es una proteína adaptadora, esta relacionada con todos los miembros de las familias de IL-1 β R y de TLR. La activación de NF- κ B y las cascadas de MAPK requieren un complejo de señal con MyD88, IL-1 β R asociada a cinasa (IRAK) y factor 6 asociado a receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF6). Cuando es estimulada MyD88 recluta a la cinasa asociada el receptor IL-1 β (IRAK). Otra proteína que puede estar implicada con IRAK y el dominio TIR del receptor es TOLLIP (proteína que interacciona con Toll), pero su función aún no se ha esclarecido con certeza. IRAK es activada por fosforilación y entonces se asocia con TRAF6, permitiendo la activación de 2 rutas de señalización distintas, JNK y NF- κ B (35). En células deficientes en MyD88 se encontró que no se producía la activación de NF- κ B y MAPKs y algunas otras respuestas biológicas como la estimulación por IL-1 β o IL-18, esto indica que MyD88 es un adaptador esencial para las 1 señales de esas citoquinas. Además la activación de NF- κ B fue anulada en células deficientes de MyD88 estimuladas con ligandos para TLR2 y TLR9, por lo que las señales de la familia TLR requieren a MyD88 como una proteína adaptadora. La activación de NF- κ B y de MAPK ante el tratamiento con LPS es retenida en células deficientes en MyD88, aunque con cinética retardada, no muestran producción de mediadores inflamatorios por parte de los macrófagos

y proliferación de células por choque entotóxico (36). Las respuestas celulares a peptidoglucanos y lipoproteínas son suprimidas en ratones deficientes de MyD88, también en células deficientes de MyD88 no muestran ninguna respuesta a CpG DNA. Finalmente en ratones deficientes de MyD88 fueron resistentes el síndrome de choque inducido por flagelina. Estos hallazgos demostraron que MyD88 es esencial para las respuestas inflamatorias mediadas por la familia TLR. Los ratones deficientes en MyD88 son altamente susceptibles a la infección por *Staphylococcus aureus*. De igual manera ratones deficientes en MyD88 en condiciones libres de patógenos específicos se mantienen sanos, pero cuando se alojaron en condiciones convencionales donde estuvieron presentes muchos patógenos, muchos de los ratones jóvenes deficientes en MyD88 sufrieron de desórdenes infecciosos como abscesos y murieron antes de destetarse. Esto indica que la activación dependiente de MyD88 es muy importante para la prevención de desórdenes infecciosos, aún cuando las inmunoglobulinas (ejemplo de la inmunidad adaptativa) son suministrados naturalmente (37).

Dentro de los miembros de la familia de TLR e IL-1R, TLR4 es único en el aspecto que su señal activa a NF- κ B y MAPK en una manera independiente de MyD88.

3.2. Significado biológico de la ruta independiente de MyD88.

En macrófagos deficientes en MyD88 la inducción de citoquinas en respuesta a LPS es bloqueada y la activación de NF- κ B se retiene, respecto a la inducción de citoquinas, existen otros efectos que induce el LPS incluyendo la producción de óxido nítrico, la formación de células B y el choque endotóxico todas estas respuestas también son bloqueadas en ratones deficientes de macrófagos. Entonces la pregunta es si tendrá alguna consecuencia biológica la estimulación de la ruta independiente de MyD88 .

Como ya se había descrito las CD expresan un vasto repertorio de TLR en su superficie celular y sufren la maduración en respuesta a varios estímulos infecciosos incluyendo LPS y CpG DNA. Este proceso puede ser duplicado *in vitro* a través de cultivos de células de médula ósea (BM) con GM-CSF. En varios ratones mutantes se ha investigado como las células dendríticas obtenidas de médula ósea (BM CDs) responden ante el tratamiento con LPS. En BN CDs deficientes de MyD88 y TLR4 la producción de citoquinas en respuesta a LPS es bloqueada, mientras que la sobreregulación de moléculas coestimuladoras es retenida en MyD88 y no en CDs deficientes de TLR4. Esta sobreregulación tiene consecuencias funcionales desde que LPS podría aumentar la actividad aloestimuladora de MyD88 deficiente en BM CDs. La inducción de moléculas coestimuladoras por LPS se ha detectado *in vitro* con células BM CDs e *in vivo* en CD11c + de células dendríticas viscerales. Entonces los dos grandes efectos biológicos provocados por LPS son la producción de citoquinas y la sobreregulación de moléculas coestimuladoras las cuales son diferentes para su requerimiento en MyD88 (38).

3.3. Bases moleculares para la ruta independiente de MyD88.

En el presente aún no está claro el mecanismo molecular de la ruta independiente de MyD88. CH3/ HeJ derivados de BM CDs muestran deterioro de la inducción de citoquinas y moléculas coestimuladoras en respuesta a LPS. Esto indica que el residuo prolina es crítico en TLR4 para ambas rutas dependiente e independiente de MyD88 y que ambas rutas probablemente se originan de la región intracitoplasmática de TLR4. IRAK parece ser un componente de la ruta dependiente de MyD88, ya que la activación de IRAK es bloqueada en CDs deficiente de MyD88. Es de notar que los macrófagos deficientes de IRAK muestran una activación retardada de las cascadas de MAPK y NF- κ B, similar a lo observado en macrófagos deficientes de MyD88.

Además en la respuesta a LPS, los fibroblastos embrionicos deficientes de TRAF6 se muestran deteriorados pero con niveles detectables de NF- κ B con una cinética retardada. Tomando estos datos se concluye que la ruta independiente de MyD88 se bifurca en la región citoplasmática de TLR4 pero converge otra vez en TRAF6 (figura 8).

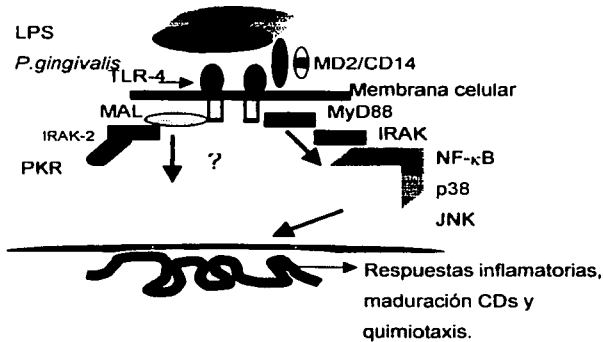


Figura 8. La activación de TLR-4 por LPS de *P. Gingivalis* toma 2 vías: una dependiente de MyD88 y otra independiente de MyD88. El adaptador parecido a MyD88 (MAL) es capaz de regular señales que activan a NF- κ B y p38 y podría interactuar con MyD88 para promover la maduración de las células dendríticas.

Se han realizado análisis de hibridación subtractiva donde varios genes inducibles se interferían, incluyendo una quimoquina CXC, la proteína 10 inducible de IFN (IP-10) y gene-1 regulador de IFN (IRG-1), fueron inducidos en macrófagos deficientes de MyD88 en respuesta a LPS. EL gen IP-10 requiere para su inducción el factor 3 regulatorio de IFN (IRF-3), y la translocación nuclear de IRF-3 en la respuesta ante LPS en células deficientes de MyD88. Por lo que es posible que la activación de IRF-3 contribuya en la ruta

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

independiente de MyD88. En el presente no se conoce como IRF3 es activado después de TLR4.

Además en respuesta a LPS, los macrófagos del hígado deficientes en MyD88, es decir, células de Kupffer, pueden secretar IL-18 activa en una de una manera dependiente de caspasa-1, sugiriendo la participación de otros factores de la ruta independiente de MyD88.

Es completamente intrigante el comparar TLR4 con otra señalización de TLR. Por ejemplo, las señales de TLR9 muestran efectos similares a las señales de TLR4, o sea inducción de citoquinas y la sobreregulación de moléculas coestimulatorias.

Sin embargo, a diferencia de TLR4, todos los efectos inducidos por la señalización por TLR9 son dependientes de MyD88 (39).

Los resultados indican que TLR4 y TLR9 pueden activar distintos mecanismos de señales y conducen a efectos biológicos similares. Entonces esto es muy importante para aclarar las diferencias entre mecanismos de señales individuales de TLR.

Recientemente, se han identificado dos grupos independientes identificados como una nueva proteína adaptadora para TLR4, llamada como proteína adaptadora contenida en el dominio TIR (TIRAP) o adaptador parecido a MyD88 (Mal). TIRAP/Mal asociado con TLR4, pero no con TLR9 es crítico para la maduración de CD inducidas por LPS. TIRAP/Mal puede formar homodímeros o heterodímeros con MyD88 y también asociarse con IRAK-2, por eso se conecta con la activación de NF- κ B. Sin embargo se desconoce si TIRAP/Mal esta involucrado en IRF3 o en la activación de caspasa. Por lo tanto los papeles de TIRAP/Mal in vivo podrían también ser aclarados.

CpG DNA induce la activación de las células inmunológicas dependiendo completamente de MyD88. Se ha descubierto que la subunidad catalítica de la proteína cinasa C dependiente de DNA (DNA-PKCs) participa en la activación celular inmunológica activada por CpG DNA. DNA-PKCs es un miembro de la

familia cinasa-fosfatidilinositol-3 (PI3K), que está implicada en el proceso de reparación de ruptura de la doble hélice de DNA dañada por estrés cuando se somete al tratamiento de radiación ionizante y por el programa de reorganización del DNA (llamado recombinación VDJ) durante el desarrollo de las células B y T. Raz y colegas (40) demostraron que los macrófagos de ratones deficientes de DNA-PKCs muestran una producción reducida de citoquinas inflamatorias en respuesta a CpG DNA. La activación de PKCs por CpG DNA permite la activación a su vez de NF- κ B. No se ha encontrado una conexión entre la ruta dependiente de TLR9-MyD88 y DNA-PKCs. Se piensa en la existencia de alguna molécula responsable de la comunicación cruzada entre TLR9 y DNA-PKCs en la vía de transducción mediada por CpG DNA.

La activación de NF- κ B independiente de MyD88 se ha encontrado en monocitos humanos THP-1 o 293 células que expresan TLR2. La estimulación de TLR2 con *Staphylococcus aureus* causa el reclutamiento de Racl activa y PI3K en la porción citoplasmática de TLR2. Esto induce la activación de Akt seguida por la activación de la subunidad p65 de NF- κ B independientemente de la degradación de I κ B α .

Estos autores mencionan que TLR1, TLR2 y TLR6 poseen un PI3K asociado en sus porciones citoplasmáticas.

3.4. Como reconocen los TLR sus ligandos.

La afinidad entre los TLRs y sus ligandos es más baja que entre las citoquinas y sus receptores. En vista de su baja afinidad los mismos TLRs parecen reconocer ligandos específicos. Esto se ha demostrado analizando las respuestas especie-específicas hacia los ligandos de TLR. Células humanas y de roedores responden diferente a LPS o a análogos de lípido A. Esas respuestas pueden ser reconstituidas en células insensibles a LPS por sobreexpresión de TLR4 humanos o de roedores. El dominio de CpG para la activación difiere entre humanos y ratones. Este reconocimiento especie-

específico del motivo CpG se encontró que es mediado por TLR 9, además, TLR9 y CpG DNA se colocan en las mismas vesículas endocíticas. Entonces esos estudios sugieren fuertemente que en la familia de TLR, TLR4 y TLR9 pueden reconocer directamente sus ligandos (tabla II).

Tabla II. TLRs y sus ligandos

TLRs	Origen de los ligandos	Ligandos
TLR2	Bacterias gram+	Lipoproteínas Peptidoglicano(TLR2/6 o TLR2/X) Ácidos lipoteicoicos
	<i>Staphylococcus</i> Bacteria	Modulina (TLR2/6)
	<i>Mycoplasma, Mycobacteria,</i>	Lipopeptidos(TLR2/X)
	<i>Spirochetes Mycoplasma</i>	Lipoproteínas, lipopéptidos MALP-2(TLR2/6)
	<i>Spirochetes</i>	
	<i>Listeria</i>	
	<i>Mycobacteria</i>	Glicolípidos Bacterias inactivadas con calor
	<i>Porphyromonas,</i> <i>Spirochetes (leptospira)</i>	Lipoarabinomanano
	Levadura	LPS
	<i>Trypanosoma cruzi</i>	
	<i>Klebsiella</i>	Zymosan(TLR2/6)
	<i>Neisseria meningitidis</i>	GPI Proteína A de la membrana exteARN Factores solubles(TLR1/2) dsARN
TLR3	Virus	
TLR4	Bacteria gram- y Bacteria gram+ Plantas Virus respiratorio sincitial Huésped	LPS Ácidos lipoteicoicos Taxol Proteína F HSP60 fibronectina del dominio A Flagelina
TLR5	Bacteria con flagela	CpG DNA no metilado
TLR9	Bacteria	

Los TLRs reconocen una variedad de ligandos, por ejemplo TLR4 reconoce LPS, proteínas (HSP60, proteína F) y dipterenos (Taxol). TLR2 además de una variedad de productos de varios microorganismos. Como se ha descrito TLR2 parece discriminar patrones finos moleculares dependiendo de la pareja

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

de receptor heterodimerizado. Por lo que es de gran importancia la caracterización para el reconocimiento de los TLR con sus ligandos.

TLR6 en combinación con TLR2 es requerido para el reconocimiento de la lipoproteína micoplasmal, que contiene una cisteína aminoterminal diacilada por lo que el reconocimiento de la cisteína triacilada de las lipoproteínas Gram-positivas y Gram-negativas no requieren TLR6.

TLR2 forma heterodímeros con TLR1 el cual crea un nuevo PRR para reconocer un PAMP de *Neisseria*. TLR1 y TLR6 podrían competir con TLR2 en la formación de heterodímeros. En contraste, TLR4 no requiere heterodimerización para su activación y no requiere un miembro adicional de la familia TLR para el reconocimiento del ligando, pero es auxiliada por la proteína MD-2 en este papel. EL reconocimiento microbiano por los receptores TLRs no se determina solamente por TLR. Una pequeña molécula secretada, MD-2, se asocia con el dominio extracelular de TLR4 y facilita la interacción de TLR4 con sus ligandos como LPS y taxol. Por otra parte una mutación en el gen codificado para MD-2 puede conducir a una insensibilidad a LPS pero no impide la interacción de MD-2 con TLR4. La respuesta a MD-2 contribuye a la formación del complejo receptor de LPS es otra cuestión para el futuro (41).

3.5. Reconocimiento patógeno de la familia TLR

Un gran número de ligandos han sido identificados a través de sistemas de estudio tanto *in vitro* y como en ratones knockout. La mayoría de esos ligandos pueden ser clasificados como PAMPs, pero los no-PAMP también como ligandos PAMP muestran jugar un papel importante en la obtención de la defensa del huésped y también en varios procesos inflamatorios.

3.6. Lipopolisacárido (LPS) y TLR4

El más caracterizado PAMP es LPS, esta molécula es componente mayoritario de la membrana de las bacterias gram-negativas. LPS está compuesto de lipopolisacáridos extendidos fuera de la superficie celular bacteriana y la porción de lípido A que se encuentra en la superficie celular.

LPS puede provocar una variedad de respuestas inmunes estimulatorias por ejemplo producción de citoquinas proinflamatorias como IL-12 y sustancias efectoras inflamatorias como el óxido nítrico. Estas actividades biológicas pueden ser atribuidas al lípido A, porción de LPS. (Fig.9) En una suficiente cantidad LPS causa clínicamente un choque endotóxico.

La proteína glicosilfosfatidilinositol (GPI), CD14, preferencialmente expresada en monocitos/macrófagos y neutrófilos, facilita la acción de LPS por unión y conservación de LPS en la superficie celular; a través de la proteína de unión a LPS (LBP). Finalmente una proteína llamada MD-2 ésta involucrada en el reconocimiento de LPS pero su mecanismo de acción es desconocido.

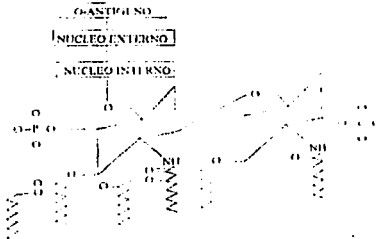


Fig. 9. Estructura química del lipopolisacárido.

En 1998 (42), mediante la utilización de análisis genéticos se identificó a TLR4 como un transductor crítico de señal para LPS. Los ratones mutantes con respuesta defectuosa a LPS (C3H/HeJ y C57BL/10ScCr), tienen una mutación

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

en el gen de TLR4. El gene TLR4 aislado de ratones C3H/HeJ codifica para un residuo de histidina en lugar de la prolina en la región intracitoplasmática que es fundamental para la señal de TLR4.

La otra cepa de ratones la C57Bl/10ScCr contiene una delección cromosomal en el locus genómico de TLR4 y como ambos ratones presentan mutaciones en la expresión o producto final del TLR4 por lo que se llegó a la conclusión de que TLR4 es importante para la señal de LPS. En ratones las mutaciones en TLR4 están asociadas con daños a la sensibilidad de LPS; (en C3H/HeJ una mutación en la región citoplasmática de TLR4 resulta en un cambio de aminoácido de prolina a histidina). En experimentos realizados *in vitro* se ha mostrado que la sobreexpresión de TLRs sensibiliza a las células en la respuesta a LPS. La disminución de CD14 en ratones muestra una respuesta reducida al LPS, demostrando que CD14 es crítico para el reconocimiento a LPS. Por otra parte se ha reportado que la asociación de CD11b/CD18 (también llamada Mac-1) en la sensibilización a LPS. En ratones deficientes CD11b/CD18, el LPS induce la producción de ciclooxigenasa 2 (COX-2) e IL-12 fue parcialmente disminuida. Miyake identificó a MD-2 como una molécula que físicamente se asocia con la porción extracelular de TLR4 y aumenta la sensibilidad ante LPS. Miyake (43) también identificó a RP105, la cual está contenida en las repeticiones ricas en leucina de la porción extracelular de los TLRs. RP105 es expresada en células B, pero no en macrófagos. En células B de ratones deficientes en RP105 se ha observado una respuesta severamente reducida a LPS, y se ha encontrado una asociación funcional de TLR4 con RP105 para el reconocimiento a LPS. El complejo TLR4-MD-2 es detectado en células B pese a su alta expresión en macrófagos peritoneales de ratones.

En los experimentos en que se produce la sobreexpresión de los TLRs muestran que TLR2 es un receptor para LPS en ciertas especies como *Leptospira* o *Porphyromonas*, actúan por medio de TLR2, porque los LPS de estas especies son estructuralmente diferente de el típico LPS de *Escherichia*

coli o *Salmonella*. Sin embargo los LPS de bacterias Gram-negativas estimulan respuestas inflamatorias a través de TLR4.

Las células de los mamíferos producen lipoglucanos, incluyendo gangliósidos y esfingolípidos esos lipoglucanos no poseen azúcares como el ketodeoxyoctonate (KDO) encontrado en LPS. Aunque CD14 es conocido que reconoce LPS y incluido en la membrana celular unido a glucosilfosfatidilinositol (GPI), podría tener una pequeña capacidad de señal. TLR4 es expresado en miocitos cardiacos en los cuales la isquemia induce su expresión (44).

3.7. TLR2 esencial para el reconocimiento de lipoproteínas y peptidoglicanos.

El receptor TLR2 fue el primero en asociarse al reconocimiento de LPS, mediante estudios de sobreexpresión de TLR2 en células 293 línea celular de embrionicas de riñon Yang *et. al.*(45). Sin embargo estudios subsecuentes en ratones carentes de TLR2 o en fibroblastos de ovario de hamster chino (CHO) genéticamente carentes de TLR2 demostraron que TLR2 no esta involucrado en el reconocimiento de LPS (46).

La sobreexpresión de TLR2 en células 293 provoca una respuesta al ligando de TLR2 en preparaciones de LPS contaminadas con otros agentes. La repurificación de LPS demostró que TLR4, pero no TLR2, es un receptor para LPS. Sin embargo aún no se sabe si TLR2 está implicado en todos los tipo de LPS o no. Dos reportes indican que la respuesta a LPS de *Leptospira interrogans* o *Porphyromonas gingivales* es mediado por TLR2 (47). Pero aún en esos reportes los autores no pueden excluir la posibilidad que muy pequeños incrementos del ligando de TLR2 contaminen la preparación de LPS. TLR2 parece expresarse sólo en células hematopoyéticas aunque hay estudios que muestran que está ampliamente distribuido en los tejidos (47).

TLR2 reconoce componentes de una gran variedad de patógenos microbiales. Estos incluyen lipoproteínas de bacterias Gram-negativas, bacterias Gram-

positivas, micobacterias y espiroquetas, peptidoglicanos, ácido lipoteicoico de bacterias Gram-positivas, lipoarabinomano de mycobacteria y zymozan de hongos.

La lipoproteínas bacterianas han sido encontradas en bacterias Gram-positivas y Gram negativas, poseen funciones inmuno-regulatorias que incluyen la activación de monocitos y macrófagos (48); los mamíferos sintetizan sus propias lipoproteínas pero estas no contienen el aminoácido terminal cisteína tripalmitilado encontrado en las lipoproteínas bacteriales, esta estructura es la responsable de la actividad inmunológica de lipoproteínas microbiales. La remoción de este elemento permite la síntesis de péptidos que contienen cisteína amino terminal lipídica que puede activar células B y macrófagos (48). Las bacterias Gram-positivas contienen una gruesa capa de peptidoglicanos (PGN) dentro de la cual se encuentran lipoproteínas y ácido lipoteicoico. Los análisis realizados en ratones deficientes en TLR2 muestran claramente que TLR2 es esencial para la respuesta a PGN .

Por otra parte Mycoplasma es un patógeno que carece de pared celular, pero que en su citoplasma contiene varias lipoproteínas o lipolipéptidos que pueden también causar respuestas inflamatorias. Uno de los lipopéptidos del *Mycoplasma*, es el lipopéptido 2 activado de macrófago (MALP-2) que tiene un peso molecular de 2 kDa, este lipopéptido utiliza TLR2 como su transductor de señal. TLR2 es importante para las respuestas ante un número de lipoproteínas derivadas de una variedad de patógenos incluyendo lipoarabinomano, la cual está asociada con glucolípidos derivados de *Mycobacterium tuberculosis* (49).

3.8. ¿Cómo puede reconocer TLR2 una amplia variedad de PAMPs?

El receptor TLR2 forma heterodímeros con otros TLRs. Esta posibilidad fue demostrada en un sistema expresado *in vitro*. Las formas dominantes negativas de TLR2 o TLR6 inhiben la expresión del factor de necrosis tumoral α

(TNF α), que normalmente es inducida por zymozan, bacterias gram-positivas o PGN. La coexpresión de TLR2 con TLR6 promueve la activación de NF- κ B y la producción de citoquinas, mientras que las células que sólo expresan TLR2 pueden inducir tales expresiones. Entonces TLR2 funciona en algunos casos formando heterodímeros con otros TLRs. Una forma dominante de TLR2 pero no de TLR6, puede también inhibir respuestas a los lipopéptidos bacterianos. Por otra parte TLR2 forma heterodímeros funcionales con TLR1, que son requeridos para el reconocimiento de ciertos factores liberados por *Neisseria meningitidis*. TLR2 parece ampliar su repertorio de especificidad con la formación de dos tipos de heterodímeros funcionales con otros TLRs. Una conclusión similar se realizó por medio de análisis *in vivo* usando ratones deficientes en TLR2 o TLR6. La estructura molecular de MALP-2 es ligeramente diferente de la lipoproteína bacteriana, ya que las lipoproteínas están diaciladas mientras que la lipoproteína está triacetilada en el residuo de cisteína N-terminal (50).

Las respuestas de ambos PAMPs fueron suprimidas en macrófagos deficientes en TLR2, pero sólo la respuesta a MALP-2 fue bloqueada en macrófagos deficientes en TLR6. Con estos resultados se concluye que TLR2/TLR6 y un heterodímero no definido, TLR2/TLR1 puede reconocer MALP-2 y lipopéptidos bacterianos respectivamente. Entonces TLR2 parece conseguir su especificidad cuando se une con otros TLRs (51).

3.9. TLR6 participa en la discriminación de lipoproteínas.

TLR1 y TLR6 se ha demostrado que funcionalmente son altamente homólogos (52). La cooperación funcional de TLR1 y TLR6 en la respuesta a los componentes de *Neisseria meningitidis* fue mostrado en un estudio de expresión ectópica de TLR1 y TLR2 en células HeLa (53). Aderem y colegas

analizaron el papel de TLR6 por la expresión de la forma negativa dominante en la línea celular de macrófago RAW264 y demostraron que TLR6 coopera con TLR2 en la detección de patrones específicos de peptidoglicano o una modulina secretada por *Staphylococcus aureus* (54). Ellos también han demostrado que TLR6 se asocia con TLR2. La generación de ratones deficientes de TLR6 ha revelado que TLR6 funcionalmente se asocia con TLR2 y discrimina entre lipopéptidos microbianos (55). TLR6 deficiente en macrófagos no mostró ninguna respuesta inflamatoria ante los lipopéptidos dipalmitoilados que son derivados del micoplasma. Sin embargo esas células responden normalmente a los lipopéptidos tripalmitoilados derivados de otras bacterias. En contraste macrófagos deficientes en TLR2 no mostraron respuesta a cualquier tipo de lipopéptidos. Esto indica la existencia de otros TLRs que funcionalmente se asocian con TLR2 en el reconocimiento de lipopéptidos tripalmitoilados. Entonces algunos TLRs parecen asociarse con otros TLRs para discriminar una fina diferencia en los componentes microbianos (55).

3.10. CpG Dna y TLR9.

Respecto a los componentes de la pared celular, los ADN bacterianos también funcionan como PAMPs. Esto lo demostró el grupo de Tokunaga (56) que encontraron una actividad inmunoestimuladora en extractos del bacilo Calmette Guérin (BCG) que podría ser atribuido a los efectos de su DNA. La actividad se demostró que requiere motivos CpG no metilados los cuales son raramente detectados en DNA de vertebrados. No solo el DNA bacteriano y los oligodeoxinucleótidos que poseen el CpG pueden manifestar actividades inmunoestimuladoras en humanos, en linfocitos de murino y en células presentadoras de antígenos. Esta estimulación lleva a la producción de citoquinas TH1 y a la regulación de moléculas coestimuladoras. Los oligodeoxinucleótidos (ODNs) contienen también motivos CpG no metilados que

activan las células inmunes. Por su actividad el CpG de ADN ha sido utilizado como un poderoso adjuvante que unido con proteínas estimula la actividad de presentación de antígeno y la maduración de células dendríticas (CD) y de esta forma se mejoran las respuestas TH1 antígeno-específico, que protegen contra muchas enfermedades infecciosas y desórdenes inmunes en modelos animales, por lo tanto CpG de DNA podría ser empleado para vacunas contra enfermedades infecciosas, cáncer y alergia (57).

Los análisis con ratones deficientes en TLR9 clarificaron la idea de que la familia TLR está involucrada en el reconocimiento del DNA bacterial como PAMP. Todo CpG del ADN induce estos efectos, incluyendo la producción de citoquinas inflamatorias por los macrófagos, proliferación de células B, la maduración de CD y la inducción del shock sistémico que fue completamente bloqueado en células deficientes en TLR9. En humanos TLR9 no es selectivamente expresado en el plasma de células dendríticas pero no en monocitos derivados de CD. El CpG de ADN puede inducir la producción de citoquinas para las primeras pero no para los monocitos de acuerdo con el hecho de que la respuesta a CpG ADN es dependiente de la expresión de TLR9. TLR9 es un crítico transductor de señal para CpG ADN. El equipo de Chu mostró que el ADN dependiente de proteína cinasa C (ADN-PKc) es esencial para los efectos de ADNs inmunoestimulatorios y pero hasta la fecha no hay evidencia de la comunicación de ADN-PKc con TLR9 (58).

CpG DNA es reconocido en el endosoma, por lo que no se ha esclarecido si TLR9 es expresado en la superficie celular o en el endosoma. Análisis citofluorométricos de corriente usando anticuerpos monoclonales contra TLR1, TLR2 o TLR4 claramente demostraron que esos TLRs son expresados en la superficie celular. Esto también sugiere que TLR9 se expresa en la superficie celular, sin embargo la activación inducida por CpG DNA de cascadas de señales tales como JNK e IRAK demostraron que una cinética retardada en

comparación a la activación inducida por LPS en macrófagos normales. Esto indica que CpG DNA no es reconocido por el mismo mecanismo como en LPS, que aparentemente activa las células después de su captura, indicando que TLR9 podría existir en el endosoma. El DNA bacterial podría ser expuesto a través de la digestión de la bacteria en el fago-endosoma antes de ser reconocido por TLR9. Entonces la existencia de TLR9 en el endosoma parece muy razonable. TLR2 el cual es usualmente expresado en la superficie celular, ha sido mostrado que es reclutado a los fagosomas después de la estimulación con zymozan. Por lo tanto TLR2 puede reconocer ligandos que son naturalmente secretados o separados de la bacteria en la superficie celular y ligandos que son expuestos después de la digestión en los endo-fagosomas (58).

3.11. Flagelina y TLR5.

El gene *tlr5* de ratón se ubica en una región distal del cromosoma 1, una región donde presenta un locus susceptible a *Salmonella* (59). En ratones *Ei/ MOLF* susceptibles a *Salmonella*, la expresión de ARNm de TLR5 fue reducida, indican que TLR5 está implicado en el reconocimiento de componentes de *Salmonella* (59). Aderem y colegas encontraron que cultivos supeARNdantes de bacterias Gram-positivas y Garm-negativas tienen la habilidad de estimular células de CHO expresando TLR5. Ellos purificaron los cultivos supeARNdantes de *Listeria monocytogenes*, e identificaron flagelina como una fracción estimulante para TLR5 (60). La mayoría de los bacilos incluyendo *Salmonella* poseen un factor soluble, flagelina. Flagelina es un constituyente monomérico de flagela bacteriana, una extensión polimérica de la membrana de la bacteria y que tiene propiedades inmunoestimuladoras (61). Aderem y colegas también demostraron que la bacteria flagelada y no la bacteria no flagelada activa TLR5, indican que flagelina es un ligando específico para TLR5 (61).

. La flagelina posee una potente actividad proinflamatoria por medio de la degradación de IκB, la activación de NF-κB y la expresión de IL-8 y inducción

de la enzima óxido nítrico sintetasa en células epiteliales de intestino. Flagelina puede ser considerada como otro PAMP. TLR5 es exclusivamente expresado en la superficie basolateral del epitelio intestinal, lo cual es consecuente al hecho que la flagelina muestra actividad inflamatoria en el área basolateral y no en la superficie apical (62).

3.12. Ligandos adicionales para TLR.

Los receptores TLR parecen reconocer tanto la infección viral como la invasión bacteriana. La relación entre virus y TLRs fue por primera vez demostrado en un reporte en el cual el mecanismo de invasión inmune por poxvirus fue examinada. Dos tipos de vacunas virales han mostrado que comparten un aminoácido similar con el dominio TIR, el cual causa la interferencia de la señal intracelular mediada por TLR. De este descubrimiento, se especula que la ruta mediada por TLR está implicada en la respuesta de defensa del huésped ante la infección por vacuna viral y el virus en turno desarrolla una invasión sistémica a través de la supresión de la señal de TLR. Subsecuentemente el receptor TLR4 está involucrado en el reconocimiento de virus esto se demostró en estudios realizados con ratones C3H/HeJ y C57BL10/ScCr que presentaban mutaciones en TLR4, la respuesta inflamatoria contra las proteínas del virus respiratorio sincicial (RSV) fue severamente reducida (63).

3.13. ARN Doble hélice (ds ARN) y TLR3

La replicación viral en células infectadas provoca una generación de ARN de doble hélice (dsARN) que puede provocar defensa antiviral. Debido que las células del huésped no producen dsARN, esta molécula puede ser considerado como PAMPs. Ratones deficientes en TLR3 muestran una respuesta disminuida a la imitación de ARN viral, ácido polinosina-policitídico (poly(I:C)), sugiriendo

que TLR3 está involucrado en el reconocimiento de dsARN. Ratones deficientes en TLR3 son una poderosa herramienta para entender el papel de TLR3 en la infección viral (64).

Se ha descrito también una proteína cinasa activada por ARN doble hélice inducible por interferon (PKR), es específica de serina y treonina presenta una masa molecular de 68 a 65 kDa en humanos y células de ratón respectivamente. La activación de esta cinasa por ARN doble hélice conduce a la autofosforilación

Se localiza en el locus 2p21 cromosoma 17 banda E2. La activación por ARN doble hélice conduce a la autofosforilación de PRKR y permite que esta cinasa fosforile a su sustrato natural, que es la factor eucariótico de iniciación de síntesis -2 (EIF2-alfa), lo que provoca una inhibición e la síntesis de proteínas. (65). El gene de esta proteína se aisló de una biblioteca genómica a partir del fago lambda.

El gene contiene 17 exones que codifican para una proteína de 551 aminoácidos.

Posteriormente Ben-Asouli (66) mostró que el ARN mensajero del interferon gama (IFNG) utilize la activación local de PKR en las células que controlan su propia traducción.

3.14. Moléculas tipo No-PAMP para receptores TLR4.

TLR4 es esencial para la defensa antiviral. Los ratones mutantes que poseen mutaciones no solo en TLR4 sino también en los genes de IL-12R β 2, presentan una deficiente inmunidad contra RSV. Por lo tanto se concluye que TLR4 es importante para la inmunidad antiviral (67).

La familia TLR es crítica para el reconocimiento de moléculas endógenas así mismo en la unión de PAMPs. Por ejemplo, la proteína de choque térmico 60 (HSP60) provoca una respuesta inflamatoria en ratones normales, pero no en ratones C3H/HeJ, lo que sugiere que esta actividad está mediada por TLR4. Vabulas y su grupo de colaboradores encontraron que tanto el HSP60 humano como el clamidial pueden activar NF- κ B y a las cinasas proteicas activadas por mitógeno (MAPKs) a través de TLR2 o TLR4 (68).

Las moléculas HSPs son liberadas de células necróticas en ciertas condiciones patológicas, como en heridas, e inducen la maduración de CD por la activación de NF- κ B. Tal activación inmune puede suministrar una base molecular para la peligrosa teoría de la activación inmune propuesta por Matzinger. De acuerdo con esta teoría, el sistema inmune no discrimina entre lo propio y lo no propio así ha sido creído pero más bien responde a los antígenos que están asociados con señales de daño liberadas de la zona dañada o células estresadas. CD91, el cual no es miembro de la familia TLR, si no que es identificado como un receptor para HSPs, está implicado en captura de HSPs, después de que TLR envía una señal para desencadenar el proceso de inflamación. Aun no está claro como la familia de TLR y CD91 funcionan como receptores de sustancias que dañan a las células (69).

Durante la inflamación o en heridas, los componentes de la matriz extracelular como fibronectina o colágena, son degradadas por proteasas, esto acelera las cascadas inflamatorias. Los fragmentos degradados de fibronectina ejercen su actividad proinflamatoria a través de TLR4. Entonces TLR4 parece ser el único involucrado en el reconocimiento de los productos de la inflamación del huésped y el primero en establecer las respuestas inflamatorias (70).

4. TRANSDUCTORES

4.1. MyD88:

Se localiza en el mapa genético en el locus 3p22-p21.3

Bonnert (71) clonó el cDNA de MYD88 que codifica para un polipéptido de 296 aminoácidos con una masa molecular de 33 kD. MYD88 de humanos comparte una 81% de homología con MYD88 de murino. La región carboxilo terminal de 150 aminoácidos tiene una significativa homología con el dominio citoplasmático del receptor a interleucina-1. Análisis de northern blot muestran que MYD88 de humanos se expresa en ARN mensajeros de 1.6 a 3 kb en una gran variedad de tejidos y líneas celulares. Bonnert (71) encontró que el gene de MYD88 presenta 5 exones y que la sobre expresión de esta proteína causa un incremento en el nivel de transcripción del promotor para interleucina-8.

Muzio (72) reportó que el dominio carboxilo termina de MYD88 tiene una significativa similitud con el dominio citoplásmico de IL1RAP. Reportó que el dominio C-terminal de MYD88 tiene una significativa homología con el dominio citoplasmático de IL1RAP.

Hardiman(73) localizó el gene MyD88 en el cromosoma 9, y se mapeó en 3p22-p21.3 por análisis de PCR del cromosoma 3 de células somáticas. Por otra parte descubrió mediante ensayos de hibridación in situ localiza el gene en 3p22-3p21.3. (Fig 10)

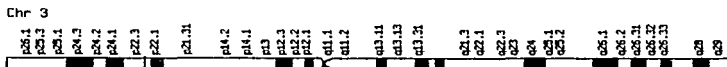
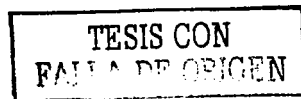


Fig. 10 Localización cromosomal de MyD88.

En el esquema se muestra el mapa del cromosoma 3, la barra que atraviesa el cromosoma es el sitio de la localización de MyD88



El factor 88 de diferenciación mieloide (**MyD88**) es una proteína adaptadora, **MyD88** y fué originalmente aislada como uno de los 12 transcriptores de ARNm que fueron inducidos en células leucémicas mieloblásticas (M1) activadas en medio condicionado para pulmón o interleucina recombinante (IL-6). Ambos el medio e IL-6 inducen el desarrollo y la diferenciación terminal de macrófagos en las células M1, se han clonado 12 cDNAs que fueron referidos como los genes de respuesta primaria de diferenciación mieloide (**MyD**). En el tiempo que la secuencia de **MyD88** no mostraba alguna homología a otras secuencias disponibles en las bases y contiene proteínas no identificadas. En 1994 la porción C-terminal de **MyD88** fue encontrada ser una secuencia conservada de aproximadamente 200 aminoácidos en las regiones intracelulares del receptor Toll de *Drosophila* y el receptor IL-1R en mamíferos, y fue entonces referido como el dominio relativo a IL-1R (**TIR**). La región de homología es limitada a tres cajas conservadas, las cuales contienen aminoácidos cruciales para señalización. La estructura del dominio **TIR** que comprende un centro, 5 dobles hélices, paralelas y β -plegadas que tiene en conjunto alrededor de un total de 5 α -hélices. Como dato, más de 50 miembros, de organismos tan diversos como las plantas, gusanos, artrópodos, mamífero e incluso bacterias, han sido añadidos a la superfamilia de proteínas **TIR**, conocidas como la superfamilia **TLR/IL-1R**. Esto sugiere que el dominio **TIR** surgió antes que se dividieran los organismos procariontas de las eucariontas. Todos los miembros de la familia tienen una función en la respuesta del huésped ante los patógenos. Cualquiera de ellos actúan como receptores de reconocimiento patógeno (**PRRs**), implicados en el reconocimiento de diversos patrones moleculares asociados a patógenos (**PAMPs**), o como intermediarios de señalización en la rutas de esos **PRRs**. Probablemente el dominio **TIR** de **MyD88** media una interacción homofílica con todos los miembros de la familia **TLR/IL-1R**. El sitio de interacción entre **MyD88** y los receptores de la superfamilia **TLR/IL-1R** es una curva extensa en la segunda caja del dominio **TIR**, el cual contiene un motivo

RDx ϕ 1 ϕ 2 (donde x representa algún aminoácido y ϕ representa un residuo hidrofóbico) con tres residuos altamente conservados. Interesantemente la ausencia de respuesta al lipopolisacárido (LPS) del fenotipo de CH3/HeJ en ratones, resulta de una mutación Pro \rightarrow His en la posición ϕ 2 en el dominio TIR de TLR4, el receptor parecido a Toll implicado en el reconocimiento de LPS. Esto evita la interacción de TLR4 y MyD88, perjudicando la respuesta al LPS. El ϕ 2 prolina está conservado en todos los TLR, excepto por TLR3, MyD88 en *Drosophila* y en IL-1R, en la cual este es reemplazado por otro residuo hidrofóbico.

La parte N-terminal de MyD88 codifica un dominio llamado muerto (DD), un motivo de aproximadamente 90 aminoácidos que fue originalmente identificado en proteínas promotoras de apoptosis. Sin embargo, muchas proteínas contenidas en el dominio muerto no tienen una función apoptótica y el DD parece tener una función en la interacción proteína-proteína. En la mayoría de las proteínas, DD están típicamente localizadas en el extremo C terminal, pero el DD de MyD88 y de la cinasa asociada a IL-1R (IRAK) y las proteínas de *Drosophila* tube y pelle, están localizadas en la porción N-terminal. DDs se dobla en un par de rizos conteniendo tres α hélice, compartiendo su estructura con la familia de las proteínas dominio reclutador caspasas (CARD), la familia de las proteínas del dominio muerto efector (DED) y la familia pirina, juntos constituyen la superfamilia DD.

Interacciones homofílicas del dominio TIR (residuos 155-296) y el DD (residuos 1-109) en MyD88 permiten la función como un adaptador entre miembros de la superfamilia TLR/IL-1R y proteínas de señalización tales como IRAK. En adición MyD88 se asocia a través de interacciones TIR-TIR y DD-DD(74).

MyD88 interacciona con los TLRs a través de su propio dominio TIR carboxilo-terminal. A través de su dominio muerto amino-terminal (DD), MYD88 hace que IRAK propague la señal proinflamatoria que por último fosforila el complejo cinasa I κ B que consiste en I κ B cinasa α y β y una proteína de andamio NEMO/IKK. Este evento de fosforilación libera a NF- κ B del citoplasma con

destino al núcleo. Ambos NF- κ B y el activador de la familia proteína -1 (c-Jun, fos, ATF2, ELIK1 y otros) sirven como factores de transcripción (algunos factores afectan la estabilidad del ARNm) en esta cadena de eventos. Por unión con elementos *cis* en muchos genes que controlan eventos inflamatorios, NF- κ B induce IL-1, IL-6, TNF- α , óxido nítrico sintetasa inducible y otros. La activación secundaria de receptores de citoquinas, los cuales son ampliamente distribuidos entre células inmunes y no inmunes, inducen cascadas de citoquinas, antagonistas de citoquinas, quimoquinas, moléculas de adhesión, agentes vasoactivos, oxidantes, antioxidantes, proteasas, antiproteasas y hormonas de estrés. Estas son involucradas en varias facetas de la defensa del huésped o la sobreregulación de la resistencia ante el estrés. Las respuestas biológicas a IL-1R e IL-18 son abolidas en ratones deficientes de MyD88. indican que MyD88 es esencial para las señales de IL-1-IL-18. De hecho ni IL-1 ni IL-18 pueden inducir el factor nuclear- κ B (NF- κ B) y la activación de la proteína cinasa activadora de mitógeno (MAPK) en células deficientes de MyD88 (75).

4.2. MyD88 en las respuestas mediadas por TLR/IL-1R.

Aunque los dominios extracelulares de los TLR y de IL-1Rs son diferentes, sus dominios intercelulares son muy similares y activan cascadas de señalización semejantes. Una de las rutas de señalización que es inducida por TLR o IL-1R es la ruta del factor nuclear κ B (NF- κ B). Los miembros de la familia NF- κ B de los factores de transcripción forman dímeros ejemplo p50/p65 que regulan la expresión de una variedad de genes celulares implicados en el control de la proliferación celular, inmunidad y respuestas inflamatorias. NF- κ B se encuentra inactiva en el citoplasma unida a una proteína inhibitoria I κ B. Durante la estimulación I κ B es fosforilada por un complejo cinasa I κ B (IKK), conduciendo a

la siguiente ubiquinación y degradación de κB por el proteosoma. Por otro lado en la ruta de NF- κB , TLRs e IL-1Rs desencadenan la ruta de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), en la cual una cascada de cinasas termina en la activación de la cinasa reguladora de la señal extracelular (ERK), p38 y la cinasa terminal N-Jun-c (JNK) que son subgrupos de MAPKs.

Esa fosforilación de varios sustratos, incluyendo el factor de transcripción AP-1 que esta involucrado en la proliferación, transformación y muerte celular. Ni IL-1R o TLR poseen una actividad de cinasa intrínseca por lo que ambos necesitan el reclutamiento de moléculas adaptadoras para la señalización como MyD88 (71). La región C-terminal de MyD88 actúa como un dominio negativo inhibidor de la activación de NF- κB inducida por IL-1R. IL-18 una citoquina estructuralmente relativa a IL-1 podría activar a NF- κB y JNK vía IL-18R. IL-18 fue originalmente clonada como un miembro de la familia de IL-1R y fue llamada proteína relativa a IL-1R. La expresión de la versión dominante negativa de MyD88 termina de la misma manera en la inhibición de la activación de NF- κB y JNK inducida por IL-18.

La vía de señalización de TLR también requiere de MyD88. La versión negativa dominante de MyD88 inhibe la activación de NF- κB inducida por TLR4 y la fosforilación de JNK como la activación de AP-1 también es inhibida (76).

Aderem y colaboradores mostraron que la expresión de la forma negativa de MyD88 en células de macrófagos RAW en ratones resulta en la inhibición de la producción de TNF- α en respuesta a bacterias gram-positivas, bacterias gram negativas, levaduras y micobacterias. Se ha encontrado que algunas proteínas virales trastornan la ruta de MyD88, las proteínas de virus Vaccinia llamadas A46R y A52R muestran secuencias de aminoácidos similares a el dominio TIR de MyD88. Y se ha mostrado que la sobreexpresión de A46R y A52R inhiben la activación de NF- κB mediada por TLR4 e IL-1 porque imitan el efecto de la forma dominante de MyD88 (76,77).

4.3. Ruta de señalización de MyD88.

Después de la estimulación con el ligando ocurre el reclutamiento de MyD88 al complejo IL-1R o a TLR, el cual desencadena la autofosforilación de IRAK. Antes de esta estimulación, IRAK es capturada por una molécula recientemente identificada llamada Tollip, entonces el complejo IRAK-Tollip es reclutado a el complejo IL-1R activado y se produce la disociación de IRAK y Tollip. La sobreexpresión de Tollip inhibe la activación de NF- κ B mediada por TLR4, TLR2 e IL-1 β . Una vez que IRAK es activada se libera del receptor y activa al factor asociado al receptor TNF 6 (TRAF6) y estimula al complejo cinasa I- κ B (IKK) y a la cinasa MAP. Los experimentos con ratones deficientes de TRAF6 revelan que TRAF6 es esencial para las respuestas celulares a los ligandos IL-1, LPS, CD40 y RANK (receptor activador de NF- κ B). Chen y colaboradores identificaron 2 complejos esenciales para la activación de IKK inducida por TRAF6, llamados TRIKA 1 y 2. TRIKA1 consiste de 2 proteínas ubiquitinadas, Ubc13 y Uev 1 A. Aunque la ubiquitinación usualmente conduce a la degradación de la proteína mediada por proteosoma, en la ubiquinación vía este complejo Ubc no ocurre. El otro activador TRIKA2 consiste en un complejo formado por la cinasa 1 asociada al factor de crecimiento transformante (TGF) β (TAK1) y las proteínas asociadas, TAB1 y TAB2. Esto ha mostrado que la ubiquitinación de TRAF6 activa al complejo TAK1 al fosforilar directamente el complejo IKK. El complejo IKK activado fosforila I κ B, conduciendo a la degradación de I κ B y entonces NF- κ B es translocado del citosol a el núcleo y activa la expresión de citoquinas proinflamatorias(77).

4.4. MAL

La presencia de una ruta independiente a MyD88 inició la búsqueda de homólogos para MyD88. En un registro de DNA de células dendríticas humanas

reveló una secuencia de genes que codificaban un homólogo de MyD88 el cual fue llamado adaptador parecido a MyD88 (Mal). Mal tiene un dominio TIR, pero a diferencia de MyD88 carece de un dominio muerte en su región amino terminal. Mal es requerido para la activación de NF- κ B por TLR4 pero no para IL-1, sugiriendo que se encuentra implicado en la ruta independiente a MyD88. Mal sólo está involucrado en la vía de transducción de TLR4, por otra parte aún no se conoce si Mal podría interactuar con MyD88 de tal manera que Mal sea específicamente requerida para IRAK2 antes que para IRAK1 (78).

4.5. IRAK-4

Se localiza en el locus Xq28 (Fig. 11)



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 11. Localización cromosomal de IRAK

Las señales de transducción mediadas por una proteína que contiene el dominio TIR fueron descritas por primera vez en la ruta de señalización de IL-1R. MyD88 es una proteína adaptadora que se asocia con la proteína IL-1R a través de la interacción de dominios TIR. El dominio muerte de MyD88 (DD), recluta entonces por la interacción con su DD una familia de proteínas cinasas asociadas a IL-1R (IRAKs). Figura (12).



Figura 12. Estructura molecular de IRAK.

Cuando IL-1 se une a su receptor IL-1R, IRAK es fosforilada y se disocia del complejo receptor y se asocia con el factor 6 asociado al receptor de factor de necrosis tumoral (TNF) o TRAF6.

TRAF6 entonces desencadena rutas de señalización que terminan con la activación de NF- κ B y otras cinasas stress como cinasa terminal c-JunNH₂ (JNK) y la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK). Esta cascada de MyD88-IRAK 1- TRAF6 funciona en la respuesta a la mayoría pero no todas las instancias de la señalización de TIR (79).

IRAK-4 tiene características únicas que la distinguen de las demás proteínas IRAK. Primero, la sobreexpresión de IRAK-4 no termina en una gran activación de NF- κ B. Segundo, la expresión de una mutación que inactiva a IRAK-4 es suficiente para la activación de NF- κ B mediada por IL-1 en células *in vitro*. Esto indica que la actividad cinasa de residuos serina- treonina de IRAK-4 es requerida para la señalización de TIR.

En repuesta a la unión de LPS a TLR4, MyD88 y Mal-TIRAP pueden ser reclutadas a TLR4, una sobreexpresión de Mal-TIRAP no puede activar a NF- κ B en células carentes de IRAK-4, indicando que IRAK es muy importante en las rutas dependientes y dependientes de MyD88 (80).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.6. TRAF

La presencia de TRAF ha sido descrita en el cromosoma 11 en la porción 11p12. (Figura 13).



Fig. 13 Localización del gene TRAF en el cromosoma 11.

Los factores asociados al receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) o TRAFs constituyen una familia de proteínas adaptadoras que se encuentran en mamíferos y en otros organismos multicelulares como en *Drosophila*. Los TRAFs mamíferos son los principales transductores de señales de la superfamilia de receptor de TNF y la superfamilia de los receptores parecidos a Toll y los receptores de interleucina 1 (IL-1R/TLR).

Un gran variedad de funciones biológicas como la inmunidad innata y adaptativa, desarrollo embriológico, la respuesta al estrés y el metabolismo del hueso son mediadas por TRAFs a través de la inducción de la proliferación, diferenciación y muerte celular. TRAFs están implicados en la transducción de señal de la proteína transformante del virus Epstein-Barr, LMP-1. En *Drosophila*, los TRAFs son esenciales para la polarización dorso-ventral y en la defensa innata del huésped que se llevan a cabo por la transducción de señal del receptor Toll (80).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla III. Actuales miembros de las superfamilias de receptor TNF e IL-1R/TLR

Superfamilia de receptor TNF.

Receptores con dominios muerte intracelulares: TNFR1, Fas, DR3, DR4, DR5, DR6, NGFR.
 Receptores con dominios muerte no intracelulares: TNFR2, LT β R, CD40, CD30, OX40, CD27, 4-1BB, RANK/TRANCE-R, Troy, HveA, EDAR, XEDAR, AITR, TACI, BCMA.

Superfamilia IL-1R/TLR

Familia del receptor IL-1: IL-1R, IL-1RA cp, IL-18R, IL-18RA cp.
 Familia del receptor parecido a Toll: TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10.

Las proteínas TRAF se caracterizan por la presencia de un dominio TRAF en el carboxilo terminal C, el cual tiene una conformación enrollada que se continua por un dominio TRAF-C conservado. El dominio TRAF tiene un papel muy importante en la función TRAF ya que media la interacción con receptores y otras proteínas de señalización. La porción N-terminal de la mayoría de las proteínas TRAF contiene un anillo con muchos dedos de zinc, los cuales son importantes para los eventos de señalización.

Muchos de los efectos biológicos de TRAF parecen ser mediados a través de la activación de factores de transcripción de la familia AP-1 y NF- κ B. NF- κ B promueve la expresión de genes involucrados en las respuestas inflamatorias y anti-apoptóticas. NF- κ B es activado por la cinasa I κ B (IKK), la cual consta de 2 subunidades cinasas, IKK α y IKK β y una subunidad regulatoria IKK γ /NEMO. La fosforilización y la degradación de I κ B conducen a la liberación y translocación de NF- κ B al núcleo lo conlleva a la activación de la transcripción. La actividad de AP-1 es estimulada por la proteína cinasa activada por mitógeno (MAP) a través de su fosforilación directa o la transcripción de componentes de AP-1. Las cinasas MAP, incluyen cinasas de residuos serina/treonina como JNKs/SAPKs, ERKs y P38s que son el final de 3 sistemas que también contienen cinasa cinasa MAP (MAP2K) y cinasa cinasa cinasa MAP (MAP3K). La

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

estimulación de AP-1 por las MAP cinasas podría provocar respuestas a estrés y promover la supervivencia y muerte celular.

Como proteínas adaptadoras los TRAFs tienen sus propias funciones biológicas y posiblemente sus diferentes rutas podrían determinar su especificidad (81).

4.7. Funciones biológicas específicas de los TRAFs de los mamíferos.

TRAF1 y TRAF2 de mamíferos fueron originalmente identificados por su asociación con TNFR2. Los otros TRAFs fueron identificados como sigue: TRAF3 por su interacción con CD40 y la proteína transformante del virus Epstein-Barr, LMP1; TRAF4 por su sobreexpresión en células de carcinoma de seno; TRAF5 por su interacción con CD40 y LT β R y TRAF6 por su participación en la transducción de señal de CD40 e interleucina-1, una citoquina que no esta relacionada a TNF (82). La función biológica de cada proteína TRAF no se relaciona con su origen de identificación (Tabla IV).

Tabla IV. Funciones de los TRAFs.	
TRAFs	Funciones
TRAF1	Protección apoptótica, regulación de la retroalimentación del receptor
TRAF2	Señal anti-apoptótica, activación JNK, supervivencia perinatal.
TRAF3	Respuesta antigénica dependiente de células T
TRAF4	Formación traqueal
TRAF5	Señalización de CD40 y CD27
TRAF2 y 5	Activación de NF- κ B
TRAF6	Metabolismo del hueso, Señal de CD40, Señal de IL-1R, Señal de LPS

TRAF6 es un mediador de señal para las superfamilias de receptores de TNF y receptores de IL-1R/TLR. En la superfamilia de IL-1R/TLR la disminución de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TRAF6 conduce a un deterioro en la señal de IL-1 e IL-18 y a la respuesta ante LPS bacteriano, el componente de bacterias gram-negativas el cual activa a TLR4. Por lo tanto TRAF6 es muy importante en la inmunidad innata contra los patógenos (82).

4.8. TAK

Se localiza en el locus 6q14-q21 (figura 14).

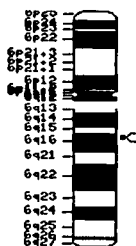


Fig. 14. Localización de TAK en el cromosoma 6

La cascada de transducción por la MAP cinasa (MAPK) constituye una unidad funcional que se acopla a señales que involucran a la proteína MAPKKK (MAP3K) que fosforila a activa a MAPKK que a su vez fosforila y activa a MAPK. En biblioteca genómica de ratón se identificó el cDNA que codificaba para una proteína de 579 aminoácidos que se nombró TAK1 (cinasa activada por TGF-beta), esta cinasa presenta un dominio de proteína cinasa en el extremo amino terminal. En células de mamíferos, TAK1 regula la transcripción de TGF-beta.

El grupo de Kondo (83) identificó que humanos y ratones presentan una homología del 99%. Mediante análisis de northern blot, TAK1 se expresa como

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

un ARN mensajero de 3kb en todos los tejidos. Se han caracterizado dos isoformas de TAK1 que difieren por la inserción de 27 aminoácidos en la posición 403.

Posteriormente Sakurai (84) clonó el cDNA para TAK1 así como 2 isoformas por splicing *alteARN*tivo, a las que denominó TAK1b (606 aminoácidos) y TAK1c (567 aminoácidos). Análisis de northern blot revelaron la expresión ubicua con transcritos de 3.2 a 5.7 kb. Análisis de desplazamiento (*supershift*) determinaron que las 3 formas de TAK1 pueden causar la translocación de NFκB al núcleo celular.

TAK1 se asocia a TAB1 y TAB2, como proteína copurifica con actividad de TRIKA2, mediante análisis de mutación se mostró que el sitio de asociación a ATP, que media la actividad cinasa y contiene una lisina en posición 63 es esencial para la función de TRIKA2. La activación mediada por la ubiquitinación de UBC12-UBE2V1, TAK1 fosforila a IKKB en las serinas 177 y 181. La activación de TAK1 por ubiquitina también provoca la fosforilación de MKK6 en serina 207 y treonina 211, lo que conduce a MKK6 estimule la actividad cinasa de JNK. La inhibición en la poliubiquitinación bloquea la activación de JNK y IKK por TRAF6. Análisis de mutación muestran que la lisina 63 de la ubiquitina es necesaria y suficiente para la activación de TAK1. Wang (85) propuso que TAK1, cuando es activada por TRAF6 ubiquitinada que ha estado unida a TAB2 después de la translocación de TAB2 de la membrana al citoplasma es una cinasa IKK. Lo que sugiere que la lisina 63 asociada a las cadenas de poliubiquitina provee de un mecanismo cinasa independiente para la activación inicial de las cinasas en un mecanismo de stress.

Por análisis de secuencia genómica Dempsey (85) determinó que el gene de MAP3K6 contiene 17 exones de un tamaño de 71 kb y que los exones *alteARN*tivos corresponden a la posición 12 y 16. Al estudiar el promotor se

encontró que la ausencia de la caja TATA y la presencia de GpC en una región rica en GC, sugiere que TAK1 es un gene constitutivo.

4.9. PGLYRP Proteína de reconocimiento a peptidoglicanos.

Esta proteína se localiza en el cromosoma 19 en el sitio 19p13.11 (Figura 15).

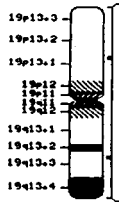


Fig. 15 Localización en el sitio 19p13.11 del cromosoma 19.

El reconocimiento inmune de moléculas no propias entre microorganismos invasores se produce mediante un patrón de reconocimientos. Los peptidoglucanos son un componente fundamental de las paredes bacterianas y es por tanto una estructura importante en el reconocimiento del sistema inmune. Kang (86) clonó el cDNA que codifica para una proteína de reconocimiento de peptidoglucanos (PGRP o PGLYRP). Esta proteína presenta 196 aminoácidos y entre roedores y humanos presenta una homología de 43%. Se expresa fuertemente en médula ósea, se forma débil en pulmón, riñón, hígado, intestino delgado, bazo, timo y leucocitos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5. Aplicaciones clínicas de receptores TLR.

La enfermedad periodontal es de tipo inflamatorio de etiología bacterial que se caracteriza por la inflamación de la encía, pérdida de hueso alveolar y en los casos más severos por la pérdida de los dientes. La respuesta del huésped ante la infección bacterial más los factores de virulencia de las bacterias se cree son las causas de la destrucción de tejido conectivo y la resorción del hueso alveolar.

5.1. La defensa innata del periodonto.

La respuesta inflamatoria es un componente fundamental para el sistema de defensa innata del huésped. La gran vascularización de los tejidos periodontales (encía y hueso alveolar) provee una abundante fuente de componentes celulares.

Estudios histológicos muestran que en condiciones normales se encuentra una "pared" de neutrófilos localizados entre las bacterias y el epitelio de unión además de la expresión de interleucina-8 (IL-8), E-selectina y de molécula-1 de adhesión intercelular (ICAM-1). La expresión de IL-8 es abundante en las capas superficiales de las células del epitelio de unión mientras que los niveles de ICAM-1 se incrementan en áreas expuestas a las bacterias. Estos mediadores inflamatorios son necesarios para la diapedesis de los leucocitos de los vasos sanguíneos y su migración hacia los tejidos.

Las células gingivales epiteliales son la principal fuente de secreción de IL-8 una potente quimioquina neutrófila (aunque las células endoteliales y los

fibroblastos también secretan esta molécula). La expresión de E-selectina en células endoteliales facilita la etapa de migración leucocitaria. Es probable que la regulación y expresión de estos mediadores moleculares faciliten el movimiento de neutrófilos hacia el surco gingival, donde tienen gran importancia para la protección bacteriana.

La pérdida de la función protectora de los neutrófilos ocasionada por deficiencia congénita o inducida químicamente con agentes antimetabólicos como ciclofosfamida conduce al desarrollo de la enfermedad. Existe una relación entre defectos congénitos de la quimiotaxis de los neutrófilos, depresión del sistema inmunológico innato y el incremento de la periodontitis severa que se observa en pacientes con diabetes tipo I y II y los que fuman cigarrillos, puro o pipa.

La inflamación puede activarse tanto en condiciones de salud y de enfermedad oral aún se conoce muy poco como influye el cambio de composición microbial en la respuesta inflamatoria. Janeway (87) propuso el concepto de receptores de reconocimiento patógeno (PRR) que identifican diferentes estructuras moleculares conservadas (PAMPs) presentes en varios patógenos.

5.2. Endotoxinas bacterianas - Lipopolisacárido.

Los lipopolisacáridos (LPSs) son derivados de la membrana exterior de las bacterias Gram-negativas, son liberadas durante la muerte bacteriana (lisis) y en parte en el crecimiento. Aunque las endotoxinas de las bacterias gram-negativas poseen un grupo diverso de sustancias existen ciertos componentes conservados en sus estructuras (figura 16).

Las moléculas de LPS se localizan en la cara externa de la membrana exterior. Están constituidos por cuatro dominios: el lípido A que posee la actividad tóxica, el núcleo interno de oligosacáridos, el núcleo externo y la región polisacárida O-antigénica. La porción más conservada de esta

estructura es el lípido A, este incluye ácidos grasos hidrofóbicos y un grupo hidrofílico de azúcares fosforilados (88).

Una de las estructuras del lípido A mejor caracterizada en las bacterias orales es la de *Porphyromonas gingivalis*.

El suero de pacientes con periodontitis es positivo para anticuerpos contra varios componentes estructurales de *P. gingivalis* incluyendo la proteína de la membrana exterior, la cápsula y la fimbria y los productos bacterianos activos biológicamente contra los anticuerpos: LPS, hemaglutinina y proteasa tipo tripsina.

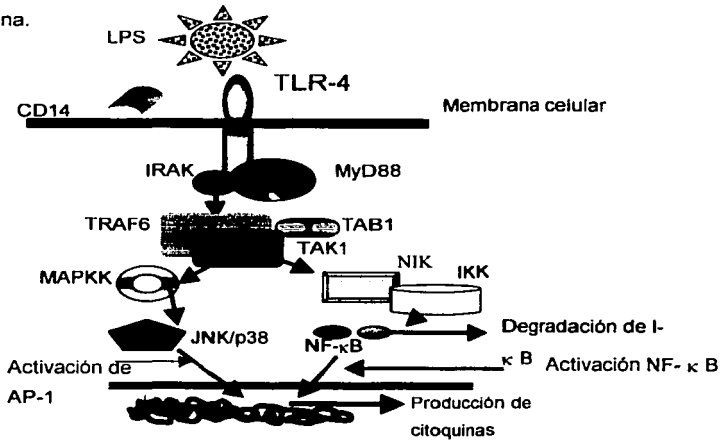


Figura 16. Modelo hipotético de la señal de LPS vía CD14 y TLR-4 en fibroblastos gingivales.

El LPS de *P. gingivalis* difiere de los otros de bacterias gram-negativas en que la estructura de la proteína de LPS carece de heptosa y deoxyoctonato3-ceto-2 y por lo tanto tiene una actividad endotóxica muy pequeña en comparación a la actividad endotóxica de LPS de enterobacterias (89). Por otra parte LPS de

P.gingivalis es un potente inductor de respuestas biológicas como resorción de hueso, activación policlonal de células B y proliferación de fibroblastos (90). LPS de *P.gingivalis* induce a los macrófagos y fibroblastos gingivales a producir citoquinas (91).

5.3. Fibroblastos gingivales como células inmunocompetentes.

Los fibroblastos son las células más abundantes en el tejido conectivo. Su función de estas células es la producción de proteínas estructurales del tejido conectivo como elastina y colágeno así como glicoproteínas y glicosaminoglucanos. Los fibroblastos periodontales son los responsables de la síntesis y degradación del tejido conectivo, secretan citoquinas inmunoregulatorias y mediadores químicos; las citoquinas están implicadas en la homeostasis del tejido y en la patogenia de muchas enfermedades infecciosas (92). En las enfermedades infecciosas la invasión de bacterias y sus productos inducen una amplia variedad de reacciones inflamatorias e inmunopatológicas, los factores microbiales y el sistema inmunológico del huésped están asociados en la etiología de la periodontitis.

Los fibroblastos gingivales que son estimulados con LPS, Interleucina-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α sintetizan IL-6 y esta a su vez activa a los osteoclastos (93).

5.4.Receptores de LPS en fibroblastos gingivales.

CD14 membranal (mCD14) y CD14 soluble (sCD14).

La molécula CD14 que fue identificada como un receptor de reconocimiento bacteriano para LPS, se localiza de dos maneras, una es el glicosilfosfatidilinositol (GPI) asociado a membrana (mCD14) y la forma soluble de CD14 (sCD14) que carece de la estructura GPI. El LPS se une por medio de su lípido A a la proteína de unión a LPS (LBP), una glucoproteína encontrada

en el suero en condiciones normales y de fase aguda e incrementa así mismo la sensibilidad de los monocitos/macrófagos y neutrófilos ante LPS. La molécula CD14 expresado en la superficie de los monocitos/macrófagos y neutrófilos funciona como un receptor del complejo de LPS y LBP; la forma sCD14 facilita la activación de las células epiteliales inducidas por LPS las cuales no expresan mCD14. CD14 no puede mediar eventos de señalización ya que no atraviesa la membrana debido a la presencia del GPI, pero es importante para la activación celular y la producción de citoquinas. (94).

Wang y colaboradores (94) mostraron que los fibroblastos gingivales expresan CD14. (Figura 17).

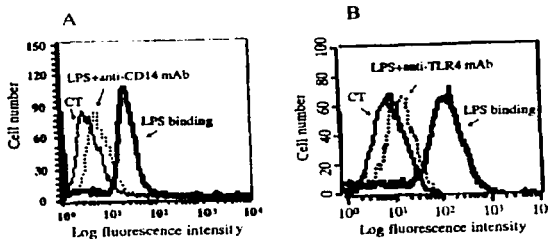


Figura 17. Efectos de los anticuerpos monoclonales anti-CD14 (A) y anti TLR-4 (B) sobre la asociación del LPS marcado con isotiocianato de Fluoresceína. Los fibroblastos gingivales humanos se incubaron con un anticuerpo control no marcado (ICT) con LPS acoplado a isotiocianato de fluoresceína o con anticuerpos monoclonales anti CD14 y LPS acoplado a isotiocianato de fluoresceína (LPS+anti CD14 mAb) y anticuerpos monoclonales anti-toll-like receptor 4 y LPS marcados con fluoresceína (LPS+TLR-4 mAb), las células se analizarán con citometría de flujo (Wang et. al. (95)).

En la figura 12 se muestra la unión del LPS a fibroblastos gingivales humanos y que la unión de LPS acoplados con isotiocianato de fluoresceína (FITC)-LPS a los fibroblastos gingivales humanos fue suprimida por el anticuerpo monoclonal anti CD14 (95). Los fibroblastos de muchos tejidos como de pulmones, piel y del periodonto son heterogéneos y que deben separarse en

subgrupos basados en la forma, tamaño y función. Los fibroblastos gingivales de las capas papilar y reticular de la lámina propia de la encía insertada son diferentes en morfología y en la producción de factores que estimulan la migración y que la expresión de CD40 esta relacionada con su fenotipo y función (95). Esto indica que los fibroblastos no son una población celular homogénea y que existe una amplia variación en relación a su forma, proliferación, expresión de marcadores de membrana, función y otras características (96).

Los fibroblastos gingivales heterogéneamente expresan CD14, receptor de IL-10 y receptores parecidos a Toll (TLRs) y pueden separarse en muchas poblaciones. Por otro lado sCD14 media la expresión inducida por LPS de la molécula de adhesión celular -1 (ICAM-1) en fibroblastos gingivales (97).

5.5. La ruta de LPS de *Porphyromonas gingivalis* vía TLR-4 (TLR4).

Una vez que TLR4 es activado por LPS la señal toma 2 rutas cerca del dominio citoplasmático. La primera es la ruta dependiente de MyD88, la cual subsecuentemente activa a IRAK, TRAF6 y NF- κ B; esta ruta es esencial para la producción de citoquinas. La segunda es una ruta independiente de MyD88 que no activa a IRAK, pero termina activando a NF- κ B. La sobreexpresión de TLR4 no sólo activa NF- κ B si no también AP-1 y la cinasa terminal N-Jun (JNK). NF- κ B y AP-1 están implicadas en la regulación de muchos genes pro-inflamatorios e inmunomodulatorios. La ruta de la cinasa MAPK también es activada en respuesta a los ligandos microbiales, la MAP3K y TAK1 parecen estar involucradas en la activación de NF- κ B inducida por LPS. TAK1 es el punto donde se bifurca la cascada MAP y la cascada IKK. AP-1 es activada por la ruta de MAPK y NF- κ B es activada por la ruta de IKK (98).

Con respecto a la ruta de señalización de los TLRs en fibroblastos gingivales humanos (HGFs), se ha demostrado que TLR4 es el receptor para LPS de

P.gingivalis e induce la producción de IL-1. Por otra parte se ha descrito que cuando los macrófagos y los fibroblastos gingivales son tratados con una alta concentración de LPS, el LPS activa ciertos receptores sin involucrar a LBP y CD14 (98).

5.6. Una opción para el tratamiento de la enfermedad periodontal.

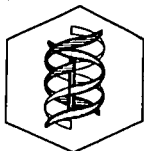
Con respecto al papel de los factores etiológicos locales en la enfermedad periodontal, la placa dental y las bacterias que habitan las bolsas periodontales liberan LPS y otros productos bacterianos en el surco gingival. Esas sustancias afectan a las células inmunológicas del tejido conectivo y a los osteoblastos. Estos productos podrían inducir la producción de citoquinas en células inmunológicas. CD14 y los receptores TLRs desencadenan respuestas biológicas inducidas por LPS en monocitos/macrófagos, neutrófilos y fibroblastos. Los componentes de las rutas de transducción de señales de LPS vía CD14 o TLRs son blancos potenciales para desarrollar terapias médicas para la prevención y tratamiento de la enfermedad periodontal, las opciones que podrían utilizarse en la terapia periodontal serían: evitar la unión de LPS a las células inmunocompetentes o evitar la inducción de rutas por la unión de LPS a CD14 o a TLR4 (99).

Ciertas proteínas de la saliva proveen funciones de defensa contra bacterias, hongos y virus, algunas de estas proteínas antibacterianas controlan la estabilización de la flora y actúan contra patógenos invasores. Se han examinado efectos de las proteínas de la saliva como mucinas, IgG, lactoferrinas, peroxidasa, amilasa, lisosimas e histatina ante LPS de *P.gingivalis* y se ha encontrado que reducen el nivel de actividad de LPS; estas proteínas también podrían ser usadas para tratar la periodontitis (100) .

6. CONCLUSIONES.

1. Con el descubrimiento de los TLRs se ha considerado a la inmunidad innata algo más que la primera defensa del huésped y un antecedente necesario para el desarrollo de la respuesta inmunológica adaptativa.
2. De los 10 miembros de la familia TLR identificados en humanos y en ratones, sólo TLR-4 participa en la señal intracelular iniciada por LPS de bacterias gram-negativas y su activación termina en la síntesis de citoquinas.
3. El conocimiento de la ruta de transducción de TLR-4 activado por LPS de *P.gingivalis* en fibroblastos puede ser la clave para desarrollar medicamentos que permitan prevenir o mejorar el tratamiento de la enfermedad periodontal.

7. ANEXOS.



ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A.C.
AMP-900928Q62

REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica, UNAM
Apartado Postal 70-281
Ciudad Universitaria., 12 de febrero de 2003.

AUTORES: CIELO RUIZ-LÓPEZ Y GLORIA GUTIÉRREZ VEENGAS

Presente

Por medio de la presente se les comunica que su artículo titulado: **"RECEPTORES TOLL Y MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN EN LA INMUNIDAD INNATA"**, se le ha entregado a los respectivos editores para su revisión, en cuanto se tengan sus comentarios se les regresará para que ustedes hagan las correcciones necesarias.

Esperando tener nuevamente noticias tuyas, reciban un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Dr. José Víctor Calderón Salinas
Editor en Jefe

Para cualquier comunicación, contactar a Marivel Rojas G.
Asistente Editorial del BEB
Tel. 623-21-70; FAX: 616-24-19
Correo electrónico: reb@laguna.fmedic.unam.mx

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

8. ABREVIATURAS.

CpG. Guanosina-fosfato-citosina.

D.C. Células dendríticas.

IL. Interleucina.

IL-1RI. Receptor tipo I- IL.

IRAK. Cinasa asociada al receptor IL-1.

LPS. Lipopolisacárido.

LRR. Repetición rica en leucina (segmento de la porción extracelular de TLR).

MBL. Lectina unida a manos.

NF. Factor de transcripción nuclear.

NO. Oxido nítrico.

PAMP. Patrones moleculares asociados a patógenos.

PRR. Receptor de reconocimiento patógeno.

SP. Proteína surfactante.

TIR. Dominio receptor IL-1-Toll (porción citoplasmática de TLR/IL-1/IL-18).

TLR. Receptor parecido a Toll.

TNF. Factor alfa de necrosis tumoral.

9. BIBLIOGRAFÍA.

1. Kiyoshi Takeda and Shizuo Akira (2001). Roles of toll like receptores in innate immune responses. *Genes to cells* **6**:733-742.
2. Mikku Hallman, Mika Rämetsä and R-Alan Ezekowitz (2001). Toll like receptor as Sensor of Pathogens. *Pediatric Research* **50**:315-320.
3. Medzhitov R. Janeway Jr (1997). Innate Immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**:295-298.
4. Hoffman J.A., Kafatos F.C., Janeway Jr C.A., Ezekowitz R.A. (1999). *Science* **284**:1313-1318.
5. Stahl PD. Ezekowitz R.A. (1998). The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol* **10**:50-55.
6. Janeway C.A. Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Colde Spring Harb Symp Quant Biol* **54**:1-13.
7. Yang R.B., Mark MR., Gray A. Huang. A., Xie M.H., Zhang M., Goddard A., Wood W., Gurney A.L., Godowski. P.J.(1998). Toll like receptor-2 mediates lipopolisaccharide induced cellular signaling. *Nature* **395**:284-288.
8. Tsuneyasu Kaisho and Shizuo Akira. (2001). Dendritic cell function in Toll like receptor and MyD88-Knockout mice. *TRENDS in Immunol* **22**(2):78-83.
9. Tsuneyasu Kaisho Akir. (2000). Toll like receptors as adjuvant receptors. *Biochimica et Biophysica Acta* **1589**:1-13.
10. Peter A. Shelling and Robert L. Modlin. (2002). Toll- like receptors: mammalian 'taste receptors' for a smorgasbord of microbial invaders. *Current Opinion in Microbiology*. **5**:70-75.
11. Akashi S, Shimazu R. Ogata H., Naga; Y.Takeda K., Kimoto M., Miyake K. (2000). Cutting edge cell surface expression and lipopolisaccharide signaling via the toll-like receptor 4- MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* **164**:4371-75.

12. Hayashi F, Smith K.D., Ozinsky A, Hawwn TR., Y; E.C., Goodlett D.R., Eng JK, Akira S., Underhill M.D., Aderem A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediate by toll like receptor 5. *Nature* **410**:1099-1103.
13. Thoma-Uszynski S, Kiertcher SM, Ochoa M.J. Bovis D.A., Norgard M.V., Miyake K., Godowski P.J., Roth M.D., Modlin R.L. (2000). Activation of toll like receptor 2 on human dendritic cell trigger induction of IL-12 but not IL-10. *J Immunol* **165**:3804-3810.
14. Baver S, Kirschning C.J., Hacker H, Redecke V, Nausman S, Akira S, Wagner H, Lipford G.B. (2001). Human TLR9 confers responsiveness to bacterial ADN via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci* **98**:9237-9242.
15. Nomura F. Alkashis, Sarao Y, Sato S, Kawait, Matsumoto M, Nakanshi K, Kimato M, Miyake K, Takedo K, Akira S. (2000). Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* **164**:5564-5574.
16. Medvedeu A.E., Kopydlowski K.M., Vogel S.M. (2000). Inhibition of lipopolisaccharide induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of citokine, chemokine and toll like receptor 2 and 4 gene expresión. *J Immunol* **164**: 5564-5574.
17. Anne M, Hocking, Tamayuk Shinomura and David J. Mac Quillan (1998). Leucine Rich Repeat Glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix biology* **17**:1-19.
18. Jean TK, Golenbock D.T. and Fenton M.J. (2000). Structure and function of toll like receptor proteins. *Lf Sc* **68**:241-258.
19. Rothberg J.M., Jacobs J.R., Goodman C.S. and Artavanis-Tsakonass S. (1990) Slit:an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. *Genes Dev* **4**:2169-2187.

20. Krantz D.E and Zipurski S.L.(1990). *Drosophila* chaopin a member of the leucine-rich repeat family, is a photoreceptor cell-specific adhesion molecule. *Eur Mol Biol Org H* **9**:1969-1977.
21. Keith F.J. and Gray N.J. (1990). The *Drosophila* membrane receptor Toll can function to promote cellular adhesion. *Eur Mol Biol Org* **9**:4299-4306.
22. Schnieder D.S., Hudson K.L., Lin TY and Anderson K.V. (1991). Dominant and recessive mutations define functional domains of Toll, a transmembrane protein required for dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* **5**:797-807.
23. Kopp E.B., Medzhitov R. (1999). The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* **11**: 13-18.
24. O'Neil L.A. and Greene C., (1998). Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects and plants *J Leukoc Biol* **63**:650-657.
25. Belvin M.P., Anderson K.V. (1996). A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**:393-416.
26. Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reicchart J.M., Hoffman J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle* /Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**:973-983.
27. Munzio M., Natoli G., Sacconi S., Levrero M. and Mantovani A. (1998). The human toll signaling pathway: divergent of nuclear factor kappa B and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF 6). *J Exp Med.* **187**:2097-2101.
28. Medzhitov R., Preston-Hurlburt P. and Janeway C.A. Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**:394-397.
29. Chaudhary P.M., Ferguson C., Nguyen V., Nguyen O., Massa H.F., Eby M., Jasmin A., Trask B.J., Hood L. and Nelson P.S. (1998). 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.

30. Rock FL, Hardiman G, Timans J.C., Kastelein R.A., and Bazan J.F. (1998). A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. Proc Natl Acad Sci **95**:588-593.
31. Heine H., Kirschning C.J., Lien E., Monks B.G., Rothe M., Golenbock D.T. (1999). Cutting edge: cells that carry A null allele for toll-like receptor 2 are capable of responding to endotoxin. J. Immunol **162**: 6971-6975.
32. Yoshimura A., Lien E., Ingalls R.R., Tuomanen E., Dziarski R. and Golenbock D. (1999). Cutting edge: recognition of gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor-2. J Immunol **163**:1-15.
33. Ulevitch R.J. Tobias P.S. (1999). Recognition of gram negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. Curr opin Immunol **11**: 19-22.
34. Ohashi, K., Burkat, V., Flohe, S., Kolb, H. (2000). Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor4 complex. J Immunol **164**:558-5561.
35. Medzhitov, R., Preston- Hurlburt, P. and Janeway, C.A. Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature **388**:394-397.
36. Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K and Akira, S., (1999). Unresponsiveness of MyD88 deficient mice to endotoxin Immunity **11**:115-122.
37. Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., T et. al. (1996). Differential roles of TLR2 y TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive cell-wall components. Immunity **11**:443-451.
38. Hasashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., et. al. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll like receptor 5. Nature **410**: 1099-1103.
39. Hacker, H., Vabulas, R.M., Takeuchi, O., Hoshino, K., Akira, S. and Wagner, H. (2000). Immune cell activation by bacterial CpG- DNA through myeloid

- differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor associated factor (TRAF 6). *J Exp Med* **192**:595-600.
40. Arbibe L., Mira, J.P., Teush, N., et. al. (2000). Toll like receptor 2 mediated NF- κ B activation requires a Rac 1- dependent pathway. *Nature Immunol* **1**:533-540.
41. S.T. Qureshi, L., Lariviere, G. Leveque, S. Clermont, K.J., Moore, P. Gros., D. Malo. (1999). *Exp Med* **1**:615-625.
42. Yang R.B., Mark M.R., Gurney A.L., Godowski A. S. (1999). Signaling events induced by lipopolisaccharide- activated toll-like receptor 2. *J Immunol* **163**:639-643.
43. Haziot A. Ferrero E., Kontgen F. Hijiya N., Yamamoto S. Silver J. et. al. (1996). Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14 deficient mice. *Immunity* **4**:407-14.
44. Yang R.B., Mark M.R., Gray A., Huang A., Xic M.H., Zhang M. et. al. (1998). Toll like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* **188**:2091-7.
45. Heine, H., Kirschning, C.J., Lien, E., Monks, B.G., Rothe, M. and Golenback, D.T. (1999). Cutting edge: cell that carry a null mutation for toll-like receptor 2 are capable for responding to endotoxin. *J Immunol* **162**: 6971-6975.
46. Hirschfeld, M., Weis, J.J., Toshchakov, V., et. al. (2001). Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonist results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun* **69**: 1477-1482.
47. Hemmi , H., Takeuchi, O., Kawai, T., et. al. (2000). A toll like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**:740-745.
48. Schwander R. Dziarski R. Weseche H. Rothe, M. Kirschning C.J. (1999). Peptidoglycan and lipoteichoic acid- induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* **274**:17406-9.
49. A. Ozinsky, D.M. Underhill, J.D. Fontenot, A.M. Hajjar, K.D. Smith, C.B. Wilson, L. Shroeder, A.. Aderem. (2000). *Natl Acad Sci* **97**:13766-13771.

50. D.H. Wyllie, E. Kiss –Toth, A. Visintin, S.C. Smith, S. Boussouf, D.M. Segal, G.W. Duff, S.K. Dower. (2000). Evidence for an accessory protein function for toll like receptor 1 in antibacterial responses. *J Immunol* **165**:7125-7132.
51. Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., et. al. (1999) TLR6: a novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene* **231**:59-65.
52. Ozinski, a., Underhill, D.M., Fontenot, J.D. et. al. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll- like receptors. *Proc Natl Acad Sci* **97**:13766-13771.
53. Takeuchi, O., Kawai T., Muhlrardt, P.F., et. al. (2001). Discrimination of bacterial lipopeptides by toll like receptor 6. *Int Immunol* **231**:59-65.
54. T.Tokunaga, H. Yamamoto, S. Shimada, H., Abe, T., Fukuda, Y. Fujisawa. Y. Furutani, O. Yano, T. Kataoka, T. Sudo et. al. (1984). *J Natl Cancer Inst* **72**: 955-962.
55. Wagner, H. (1999). Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger. *Adv Immunol* **73**:329-367.
56. Visintin, a., Mazzoni, A., Spitzer, J.H., Willie, D.H., Dower, S.K. and Segal, D.M. (2001). Regulation of toll like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* **166**: 249-255.
57. Sebastiani, G., Leveque, G., Lariviere, L. et. al. (2000). Cloning and characterization of the murine toll- like receptor 5 (Tlr5) gene sequence and mRNA expression studies in *Salmonella*- susceptible MOLFIE mice. *Genomics* **64**: 230-240.
58. Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A. et. al. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by toll-like receptor 5. *Nature* **410**: 1099-1103.
59. Eaves- Pyles, T., Murthy, K., Liaudet., L. et. al. (2001). Flagellin a novel mediator of *Salmonella* induced epithelial activation and systemic inflammation: I κ -B α degradation, induction of proinflammatory mediators and cardiovascular dysfunction. *J Immunol* **166**:1248-1260.

60. A.T. Gewirtz, J.Simon, C.K. Schmitt, L.J., Taylor, C.H. Hagedorn, A.D. O'Brien, A.S. Neish, J.L. (2001). *Madara J Clin Invest* **107**: 99-109.
61. Kurt Jones, E.A. Popova, L., Kwinn, L., et. al. (2000). Pattern recognition receptor TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nature Immunol* **1**: 398-401.
62. L- Alexpoulos A.C. Holt, R. Medzhitov R.A., Flavell (2001). *Nature*. **413**: 732-738.
63. E.A. Kurt-Jones, L.Popova, L. Kwinn, L.M. Haynes, L.P. Jones. R.A. Tripp, E.E. Walsh. M.W. Freeman., D.T. Golenboc. L.J. Anderson. R.W. Finberg. (2000). *Nat Immunol* **1**: 398-401.
64. A. Poltorak T. Merlin, P.I. Nielsen. O. Sandra, I. Smirnova, I. schupp, T. Boehm, C. Galamos. M.A. Freudenberg. (2001). *J Immunol* **167**: 2106-211.
65. Barber, G.G. N.; Edelhoff, S.; Katze, M. G.; Distech, C. M. : Chromosomal assignment of the interferon-inducible double-stranded ARN-dependent protein kinase (PRKR) to human chromosome 2p21-p22 and mouse chromosome 17 E2. *Genomics* **16**: 765-767, 1993.
66. Ben-Asouli, Y.; Banai, Y.; Pel-Or, Y.; Shir, A.; Kaempfer, R. : Human interferon-gamma mRNA autoregulates its translation through a pseudoknot that activates the interferon-inducible protein kinase PKR. *Cell* **108**: 221-232, 2002.
67. K. Ohashi. V. Brukat, S. Flohe H., Kolb. (2000). *J Immunol* **164**: 558-561.
68. S. Basu, R.J. Binder, T. Ramalingam. P.K. Srivastava. (2001). *Immunity* **14**:303-313.
69. M. Muzio, N. Polentarutti, D. Bosisio, P.P. Manoj Kumar and A. Mantovani. (2000) Toll like receptor family and signalling pathway. *Biochemical Society* **28**: 563-566.
70. Pascal Knuefermann, MD; Shintaro Nemoto, MD, PhD; Georg Baumgarten, MD; Arunima Misra, MD; Natarajan Sivasubramanian, PhD; Blasé A. Carabello, MD; and Jesus G. Vallejo, MD. (2002) Cardiac Inflammation and

- innate Immunity in Septic Shock. Is there a Role for Toll like receptors?
CHEST **121**: 1329-1335.
71. Bonnert, T. P.; Garika, K. E.; Parnet, P.; Sonoda, G.; Testa, J. R.; Sims, J. E.
: The cloning and characterization of human MyD88: a member of an IL-1
receptor related family. *FEBS Lett.* **402**: 81-84, 1997.
72. Muzio, M.; Ni, J.; Feng, P.; Dixit, V. M. : IRAK (Pelle) family member IRAK-2
and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* **278**: 1612-
1615, 1997.
73. Hardiman, G.; Jenkins, N. A.; Copeland, N. G.; Gilbert, D. J.; Garcia, D. K.;
Naylor, S. L.; Kastelein, R. A.; Bazan, J. F. : Genetic structure and
chromosomal mapping of MyD88. *Genomics* **45**: 332-339, 1997.
74. Sophie Janssens and Rudi Beyaert. (2002). A universal role for MyD88 in
TLR/IL-1R mediate signaling. *TRENDS in Biochemical Sciences* **27**(9):473-
482.
75. Tsuneyasu Kaisho and Shizuo Akira. (2001). Dendritic cell function in Toll
like receptor and MyD88 Knockout mice. *TRENDS in immunology* **27**(2):78-
83.
76. Muzio, M. et. al.(1997). IRAK (pelle) family members IRAK-2 and MyD88 as
proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* **278**:1612-1615.
77. B.Berther H. Wagner. (2002). Toll like receptor family members and their
ligands. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **270**:158-163.
78. Fitzgerald, K.A. et. al. (2001). Mal (MyD88 adapter like) is required for toll-
like receptor 4 signal transduction. *Nature* **413**:78-80.
79. Arch., R.H., Gedrich, R.W. and Thompson, C.B. (1998). Tumor necrosis
factor receptor-associated factor (TRAFs) a family of adapter proteins that
regulates life and death. *Genes Dev* **12**:2821-2830.
80. Jee Y. Chung, Young Chul Park, Yong Ye and Hoo Wu. (2002). All TRAFs
are not created equal: Common and distinct molecular mechanism of TRAF-
mediated signal transduction. *JouARNI of Cell of Science* **115**: 679-681.

81. Fitzgerald, K.A. et. al. (2001). Mal (MyD88 adapter like) is required for toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* **413**: 78-83.
82. Janeway C.A. Jr. (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* **13**:11-6.
83. Demp Dempsey, C.E.; Sakurai, H.; Sugita, T.; Guesdon, F;AlteARNtive splicing and gene structure of the transforming growth factor beta-activated kinase 1. *Biochim. Biophys. Acta* **1517**: 46-52, 2000.
84. Kondo, M.; Osada, H.; Uchida, K.; Yanagisawa, K.; Masuda, A.; Takagi, K.; Takahashi, T.; Takahashi, T. : Molecular cloning of human TAK1 and its mutational analysis in human lung cancer. *Int. J. Cancer* **75**: 559-563, 1998.
85. Wang, C;Deng, L.; Hong, Akkaraju, G. R.; Inoue, J.; Chen, Z. J. : TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* **412**: 346-351, 2001.
86. Kang, D.;Liu, G.; Lundstrom, A.; Gelius E.; Steiner, H. : DA peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **95**: 10078-10082, 1998.
87. Brian W. Bainbridge and Richard P. Darveau. (2001). *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide: an unusual pattern recognition receptor ligand for the innate host defense system. *Acta Odontolo Scand* **59**:131-138.
88. Ogawa T. (1994). Immunobiological properties of chemical defined lipid A from lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis*. *Eu J Biochem* **219**:737-742.
89. Takada H, Mijara J., Morisaki I, Hamadas (1991). Production of citokines by human gingival fibroblast in periodontal disease: pathogens and host

- immune responses. Hamada S, Holt SC, Mc Ghee J.R., editors, Tokyo: Quintessence Publishing. pp. 265- 276.
90. Hefti A.F. (1993). Aspects of cell biology of the normal periodontum. *Periodontology* (2000) **3**: 64-75.
91. Hailman E, Linchenstein H.S., Wufel MM, Miler D.S., Johnson D.A., Kelley M. et. al. (1994). Lipopolysaccharide (LPS) binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med* **179**:269-277.
92. Wang D-L., Sato K., Oido M, Fujii T., Kowashi Y., Shinohara M, et. al.(1998). Involvement of CD14 on human gingival fibroblast in *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide mediated interleukin-6 secretion. *Arch Oral Biol* **43**:687-694.
93. Donyari- Baytzooglou A.I., Warren W.D. Berton M.T., Ebersole J.L. (1997). CD40 expression by gingival fibroblast: correction of phenotype with function. *Int J Immunol* **9**:1235-1244.
94. Haziot A. Hijiya N., Goyert S.M. (1998). Role of CD14 in infection: studies in CD14 deficient mice. *Prog Clin Biol Res* **397**:255-260.
95. Hayashi J. Masaka T, Ishikawa I. (1999) increased soluble CD14 serum levels in periodontitis patients. *Infect Immun* **67**:417-420.
96. Chan V.W., Mecklenbrauker I, Sul, Texido G., Leitges M., Carsetti R, et. al. (1998). The molecular mechanism of B cell activation by toll-like receptor RP-105. *J Exp Med* **188**:93-101.
97. Wang P.L., Oido- Mori M, Fujii T., Kawashi Y., Kikuchi M, Suetsugu Y, et. al. (2001). Heterogenous expression of Toll-like receptor 4 and down regulation of Tll-like receptor4 expression on human gingival fibroblast *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun* **288**: 863-867.
98. Kanehira T, Tani H, Wang P-L., Ohura K, Kubok Y. (2000). Simple and Rapid purification of histatins using hidroxyapatite chromatography in denaturalized conditions. *Jpn J Oral Biol* **42**:160-165.

99. Wang D.L. Azuma Y, Shinohara M, Tonuka J., Okura k.(2001). Effect of salivary proteins on *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide activity. *Dentistr Jpn* **37**: 39-41.
100. Atsutoshi Yoshimura, Takashi Kaneko, Yoshifumi Kato, Douglas T. Golenbock, and Yoshitaka Hara. (2002). Lipopolyseccarides from Periodontopathic *Bacteria Porphyromonas gingivalis* and *Capnocytophaga ochracea* Are Antagonist for human Toll- Like Receptor 4. *American Society for Microbiology* **70**(1):218-220.