

Receptores de Tipo Toll y su Implicancia en Autoinmunidad

María Angélica Marinovic M.

Inmunóloga Clínica

Unidad de Reumatología e Inmunología

Depto. Medicina Interna

Hospital Clínico San Borja-Arriarán

Universidad de Chile

El Sistema Inmune (SI) detecta y elimina microorganismos patogénicos invasores porque es capaz de discriminar entre lo propio y lo ajeno.

En los mamíferos, el sistema inmune se divide en SI innato y SI adaptativo; este último se ha estudiado extensamente en el último siglo; sin embargo, hasta hace poco tiempo poco se sabía del SI innato. El SI innato es la primera línea de defensa frente a las infecciones. No se sabe con certeza cómo éste discrimina y reconoce lo no propio; sin embargo, la reciente identificación de los Receptores de Tipo Toll (RTT) en mamíferos ha venido a dar cuenta del importante rol que juega el SI innato en la detección de los microorganismos patogénicos invasores. Los RTT son una familia de proteínas de membrana que actúan como receptores de reconocimiento de patrones específicos para diversas moléculas microbianas y que estimulan respuestas del SI inmune innato frente a microorganismos que expresan estas moléculas, así como también regulan la activación del SI adaptativo. La primera proteína identificada de esta familia fue la proteína Toll de la *Drosophila*, que participa en el establecimiento del eje dorsoventral durante la embriogénesis de la mosca, así como también en la respuesta inmune a hongos y a algunas bacterias en la mosca adulta.

Un año después se identificaron proteínas similares en los mamíferos, las cuales se denominaron de tipo Toll por su homología de secuencias con Toll de *Drosophila*. Hasta la fecha se conocen alrededor de 11 RTT en los mamíferos, las cuales se denominan RTT 1 al 11. Aunque probablemente son más, aún no se han identificado.

Todos estos receptores se caracterizan por tener repeticiones ricas en leucina flanqueadas por estructuras características ricas en cisteína en sus regiones extracelulares y un dominio citoplasmático homólogo al receptor de IL-1 (TIR), el cual es esencial para la transducción de señales.

Los dominios TIR también se encuentran en las colas citoplasmáticas de los receptores de IL-1 e IL-18 y par-

ticipan en vías de transmisión de señales similares con RTT, IL-1 e IL-18. Los RTT se expresan en muchos tipos celulares diferentes que forman una parte importante del SI innato, tales como los macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células epiteliales mucosas, células endoteliales, así como también en la mayor parte de los tejidos; sin embargo, el nivel de expresión puede afectarse por diversos factores, por ejemplo, factores de crecimiento y citoquinas. Los RTT de los mamíferos participan en la Respuesta Inmune a diferentes tipos de moléculas que se expresan con frecuencia en las células microbianas, pero no en las células del huésped. Estas moléculas se denominan patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP), la mayoría de las cuales son compartidas por una gran variedad de agentes infecciosos, y su estructura es esencial para la fisiología y supervivencia de estos microorganismos.

Algunos de estos productos microbianos que estimulan a los RTT son: el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram negativas, el peptidoglucano de las bacterias Gram positivas, las lipoproteínas bacterianas, el ácido lipoteicoico, el lipoarabinomano, el zimosano, la proteína del flagelo bacteriano flagelina, la proteína del shock térmico 60, la proteína de fusión del virus respiratorio sincicial, las estructuras CpG no metiladas y el RNA de doble hebra.

De acuerdo a la comparación de secuencias aminoácidas, la familia RTT se ha dividido en subfamilias: RTT3, RTT4, RTT5, RTT2 y RTT9 (Figura 1).

RTT 4

El año 1998 se demostró que estaba involucrado en el reconocimiento de LPS.

Este reconocimiento requiere además de la participación de otras moléculas asociadas. En el caso del LPS, éste se une a una proteína de unión al LPS (LBP), presente

en el suero, y este complejo LPS-LBP es reconocido por la molécula CD14, expresada preferentemente por monocitos, macrófagos y neutrófilos.

La estimulación por LPS es seguida por un aumento en la proximidad física entre CD14 y el RTT 4, lo que sugiere que CD14 y RTT 4 interactúan en las señales inducidas por LPS.

También participa la proteína MD-2, la cual se asocia con la porción extracelular del RTT4 y aumenta la respuesta al LPS.

Otra proteína de superficie celular, la RP-105, también está involucrada en el reconocimiento de este ligando.

Esta proteína contiene un dominio relacionado estructuralmente a aquellas encontradas en la porción extracelular de los RTT y se expresa preferentemente en la superficie de los linfocitos B (Figura 2).

Además del LPS, el RTT 4 reconoce otros ligandos, como el Taxol, el cual tiene actividad antitumoral; también reconoce a la proteína de fusión del virus respiratorio sincicial (VRS). Se ha demostrado que ratas que presentan una mutación del RTT 4 exhiben una respuesta inflamatoria y un *clearance* reducido del VRS.

El RTT 4 también es capaz de reconocer ligandos endógenos, como la proteína de shock térmico 60 (HSP60), la cual estimula a los macrófagos y células dendríticas para que secreten citoquinas proinflamatorias y expresen moléculas coestimuladoras. La HSP60 es una de las “señales de peligro”, es decir, moléculas que se liberan por parte de células que están sufriendo estrés o necrosis. Estas señales son reconocidas por los macrófagos y células dendríticas, lo que gatilla una respuesta inmune.

Estas moléculas endógenas activan células inmunes sólo cuando están presentes en altas concentraciones, a diferencia de las concentraciones requeridas para el LPS.

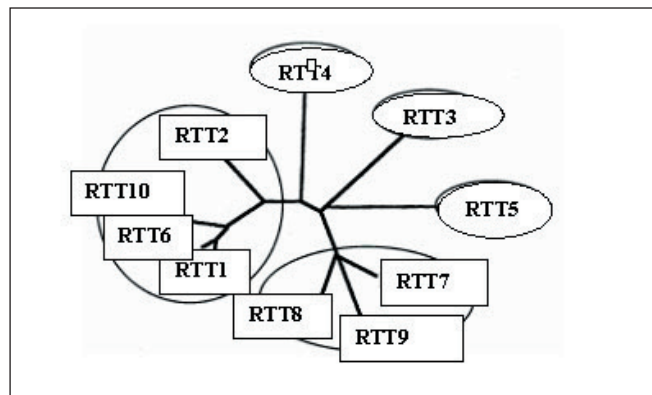


Figura 1.
Subfamilias de Receptores de Tipo Toll
Tomada de Takeda et al., Annu Rev Immunol 2003; 21:335-376.

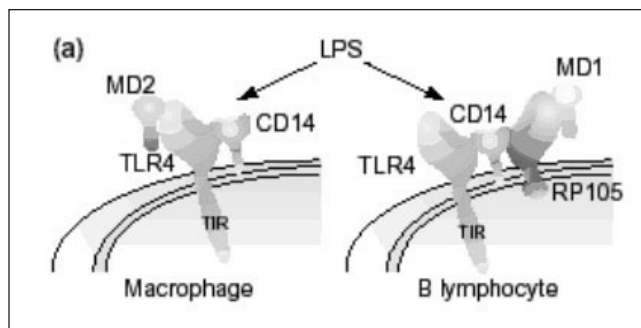


Figura 2.
RTT 4 y moléculas que participan en el reconocimiento de LPS.
Tomada de Imler JL. Trends in Cell Biology 2001; 11(7):304-11.

RTT 2, RTT 1 Y RTT 6

Los RTT 2 reconocen distintos componentes microbianos, como lipoproteínas de bacterias Gram negativas, Mycoplasma y espiroquetas, peptidoglicán y ácido lipoteicoico de bacterias Gram positivas, lipoarabinomananos de Mycobacterias y glicoinositolfosfolípido del *Trypanosoma cruzi*.

Se ha demostrado que ratas deficientes en RTT 2 tienen mayor susceptibilidad a presentar infecciones por bacterias Gram positivas, como el *Staphylococcus aureus*.

RTT 2 coopera con los RTT 1 y 6 en el reconocimiento de lipopéptidos microbianos, ya que forman heterodímeros.

RTT 1 reconoce lipopéptidos y lipoproteínas de Mycobacterias.

RTT 5

Funciona principalmente como un homodímero.

Reconoce a la flagelina, la proteína principal que forma parte de los flagelos de las bacterias, factor de virulencia fundamental en la unión a la célula huésped. Esta es capaz de inducir una respuesta inmune muy potente.

RTT 3

Reconoce al RNA viral de doble hebra.
Se expresa en células dendríticas maduras.

RTT 9 Y RTT 7

El RTT 9 es esencial en el reconocimiento del CpG no metilado del DNA bacteriano, el cual es considerado un potente inmunoestimulante.

El CpG activa a las células dendríticas para que éstas produzcan citoquinas de tipo Th1, como la IL-12, desencadenándose una respuesta inmune de tipo Th1, es decir, mediada por células.

A diferencia de los otros RTT, el RTT 9 se localiza intracelularmente en endosomas, y es aquí donde reconoce a sus ligandos.

RTT 7 y RTT 8 presentan alta homología con RTT 9, pero sus ligandos no están tan claros (Figura 3).

Se sabe que RTT 7 reconoce ligandos sintéticos, como las imidazoquinolinas, una de las cuales es el Imiquimod, el cual se utiliza en el tratamiento de las verrugas genitales causadas por virus papiloma.

Este medicamento tiene un potente efecto antiviral y antitumoral, ya que induce secreción de citoquinas proinflamatorias, especialmente del Interferón gamma (IFN- γ).

Otros dos inmunomoduladores, la loxoribina y la broprimina, también son reconocidos por el RTT 7, y éstos son capaces de aumentar la actividad de las células *Natural Killer* (NK) e inducir la producción de citoquinas como los interferones. La bropirimina se ha utilizado en el tratamiento del carcinoma renal por su capacidad de inducir la producción IFN- α .

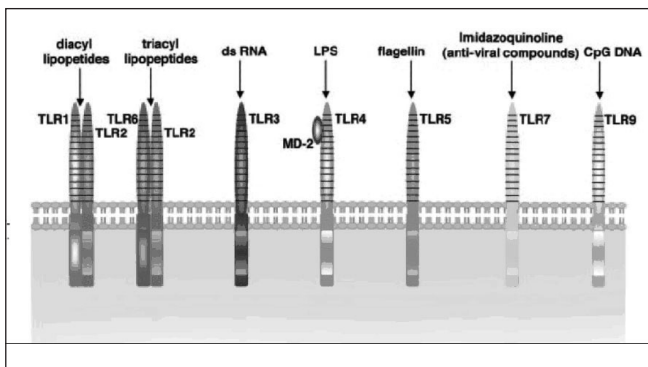


Figura 3. Ligandos de los RTT. Tomada de Akira S. Journal Biol Chem 2003; 278:38105-8

DISTRIBUCION DE LOS RTT

Los monocitos/macrófagos expresan la mayoría de los RTT, excepto los RTT 3.

La expresión de RTT en las células dendríticas (CD) depende del subtipo de ésta, es decir, si son CD Plasmocitoides (CDP) o CD Mieloides (CDM).

Las CDM expresan RTT 1, 2, 4, 5 y 8, mientras que las CDP expresan RTT 7 y 9.

RTT 3 se expresa únicamente en CD maduras.

Hay varios RTT que se expresan preferentemente en las células B.

Además de las células del SI, los RTT también se expresan en otras células que participan en las respuestas inflamatorias, por ejemplo, las células de la superficie basocelular del epitelio intestinal que expresan RTT 5.

RTT 4 se expresa en bajas concentraciones en el epitelio intestinal normal; sin embargo, está muy aumentado en Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Esto apoya la teoría de que esta enfermedad resultaría de una respuesta inflamatoria exagerada a bacterias intestinales.

La expresión de los RTT en las células epiteliales está finamente regulada, lo que explica por qué bacterias Gram negativas patógenas y no las comensales inducen la respuesta inflamatoria.

La expresión de los distintos RTT es regulada por distintos factores: invasión microbiana, componentes microbianos y citoquinas.

Estudios experimentales han demostrado que su expresión puede ser suprimida por el tratamiento con anticuerpos anti IFN- α e IFN- β .

Las vías de transducción de señales predominantemente utilizadas por los RTT activan al Factor de Transcripción Nuclear NF- $\kappa\beta$ (Figura 4).

En esta vía, la unión del ligando al RTT de la superficie celular atrae varias moléculas citoplasmáticas de señalización a través de interacciones entre dominios específicos. La primera proteína reclutada es la proteína adaptadora citoplasmática MyD88. Una segunda proteína atraída al complejo de señalización es la cinasa, asociada al receptor de IL-1 (IRAK); ésta se autofosforila, se disocia de MyD88 y activa al Factor asociado a TNF- R6 (TRAF-6). Este finalmente origina la activación de NF- $\kappa\beta$.

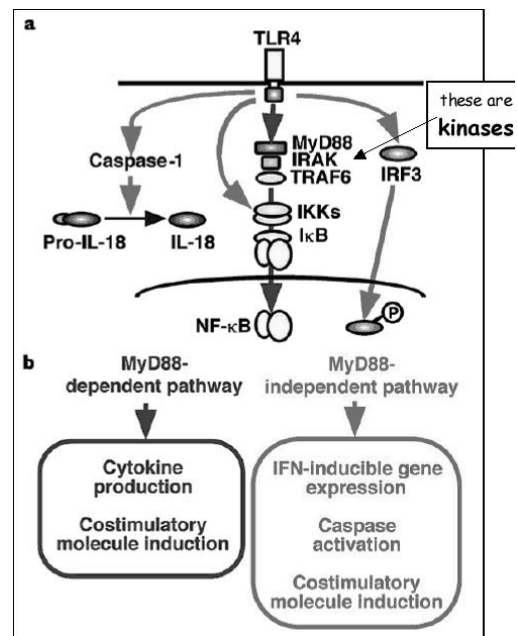


Figura 4. Vías de transducción de señales. Tomada de Akira S. Nature Immunol 2001; 2(8): 675-680.

Los genes que se expresan en respuesta a las señales del RTT codifican proteínas importantes que participan en la RI innata, como citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 e IL-12), moléculas de adhesión endotelial (selectina E) y enzimas que participan en la destrucción de patógenos (sintetasa de óxido nítrico inducible).

Los genes expresados van a depender del tipo de célula estimulada.

Existen otras vías de transducción de señales, como la cascada de MAP cinasa, que provoca la activación de otro Factor de transcripción: el AP-1.

También existen vías independientes de MyD88.

REGULACION DE LA INMUNIDAD ADAPTATIVA POR LOS RTT

El reconocimiento de los componentes microbianos por los RTT desencadena una respuesta del SI innato y posteriormente del SI adaptativo.

Las señales para la activación de este último son provistas por las CD. Las CD inmaduras de la periferia tienen una gran capacidad de endocitosis, lo que facilita la captación de los antígenos. Estas son activadas por distintos componentes microbianos, lo que las hace madurar. Cuando maduran, expresan muchos de los RTT.

El reconocimiento mediado por los RTT induce la expresión de moléculas coestimuladoras, como CD80/86, y la producción de citoquinas proinflamatorias, como la IL-12. Una vez que maduran pierden la capacidad de endocitar y migran a los ganglios linfáticos, donde les presentan los antígenos a las células T vírgenes. De esta manera, entonces, se desencadena la participación del SI adaptativo.

La activación de RTT 4 y 9 induce la producción de IL-12, desviando la respuesta inmune hacia una respuesta de tipo Th1.

También la producción de IFN- α y β inducida por RTT promueve la maduración de las CD e induce la producción de quemoquinas tipo Th1.

Las CD responden a distintos estímulos, con producción de distintas citoquinas. En humanos las CDM producen IL-12 en respuesta a LPS, mientras que las CDP producen preferentemente IFN- α después de una infección viral y también en respuesta a CpG bacteriano.

RELACION DE LOS RTT CON AUTOINMUNIDAD

A pesar de que no se conoce la causa de las enfermedades autoinmunes, por mucho tiempo se ha especulado que un agente infeccioso podría jugar algún rol en éstas,

tanto en su iniciación como en su progresión, actuando como un gatillante inespecífico del SI.

Actualmente se está investigando el posible rol que podrían tener los RTT en la patogenia de ciertas enfermedades autoinmunes.

Hasta la fecha se conoce lo siguiente:

La maduración de las Células Presentadoras de Antígeno (CPA) en respuesta a señales recibidas por el SI innato puede llevar al quiebre de la tolerancia; este proceso es activado principalmente por RTT que han sido estimulados por autoantígenos.

La exposición prolongada a IFN tipo I puede romper la tolerancia e iniciar una reacción autoinmune y eventualmente llevar al desarrollo de una enfermedad autoinmune, por ejemplo, el Lupus Eritematoso Sistémico (LES). Se ha observado que pacientes con LES tienen inductores endógenos de IFN- α , lo que aumenta la producción de éste y como consecuencia hay una estimulación continua del SI.

Las CDP son las principales células productoras de IFN- α , y lo producen en grandes cantidades al ser estimuladas a través de RTT 7 y 9.

Aún no está claro cuál sería el estímulo, pero los posibles candidatos serían: complejos inmunes (CI), DNA, RNA y virus.

Krieg demostró la importancia del rol inmunoestimulador de las secuencias CpG bacterianas, las cuales actúan a través de RTT 9.

También se ha demostrado la capacidad de los CI que contienen CpG de inducir la producción de IFN- α , así como la activación de células B y anticuerpos anticromatina con la participación de los RTT 9.

El IFN- α podría activar el SI aumentando la sensibilidad de éste a los estímulos, como los ligandos endógenos (CI, productos de daño tisular) o exógenos (infecciones virales).

El IFN- α también puede ser producido por la estimulación de RTT 3 por RNA de doble hebra y por estimulación de RTT 7 y 8 por RNA de una hebra.

Muchos de los efectos del IFN- α se observan en los pacientes con LES, en los cuales se han descrito niveles elevados de esta citoquina:

- IFN- α media la maduración de las CD y activa a los macrófagos hacia un perfil funcional con capacidad aumentada de activar células T alogénicas. Estas células tienen una capacidad aumentada de generar un repertorio rico en células T autorreactivas.
- Además, esta citoquina aumenta la sobrevivencia de linfocitos Th, y por otro lado promueve la fagocitosis al inducir la expresión del ligando Fas en las células NK.
- Recientemente se ha demostrado que el IFN- α también participa apoyando la diferenciación de las células B y el switch de clases de inmunoglobulinas.

En pacientes con Artritis Reumatoide (AR) los fibroblastos de la membrana sinovial se consideran las células clave en la destrucción articular. Recientemente, en estudios centrados en la búsqueda de factores estimulantes de la activación de estos fibroblastos, se ha estudiado la presencia de RTT que inician señales de activación en estas células.

Se demostró que los fibroblastos sinoviales de AR en cultivo expresan RTT 2. Estos RTT 2 reconocen varios componentes microbianos, siendo los peptidoglicanos los más importantes.

La expresión de estos RTT 2 aumentó al ser estimulados con citoquinas proinflamatorias y después de la exposición a lipopéptidos y lipopolisacáridos sintéticos. Además, se encontró que las señales mediadas por RTT 2 en los fibroblastos resultan no solamente en una regulación positiva del NF- κ B, ciertas metaloproteinasas de la matriz, y ciclooxigenasa 2, sino también más impresionantemente en el aumento masivo de producción de potentes quemoquinas. Estas quemoquinas fueron detectadas posteriormente en el tejido sinovial, así como también en el líquido sinovial de pacientes con AR.

Actualmente se ha diseñado una nueva proteína de fusión RTT 2 para bloquear las señales mediadas por RTT 2 y así inhibir la activación de los fibroblastos sinoviales en AR.

También se ha postulado el rol de los RTT en la patogenia del Síndrome Antifosfolípido, debido a que se sabe que los anticuerpos antifosfolípidos se unen a la célula endotelial, y su antígeno principal es la β 2 Glicoproteína I (β 2GPI) y la unión de los anticuerpos anti β 2GPI a la célula endotelial induciría la activación de ésta, resultando en la expresión de un fenotipo proinflamatorio y procoagulante. La activación de la célula endotelial es mediada por RTT con translocación desde el citoplasma al núcleo del NF- κ B. Debido a la homología entre la β 2GPI y agentes microbianos (principal ligando de los RTT) se ha sugerido el rol del SI innato en este síndrome.

Estudios en Enfermedad Inflamatoria Intestinal han demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* que LPS y CpG bacterianos aumentan la RI de tipo Th1 a nivel intestinal, a través de la producción por parte de las CD de IL-12.

Además, se ha demostrado que los linfocitos T (LT) reguladores expresan un repertorio limitado de RTT y que en respuesta a LPS los LT reguladores proliferan y aumentan su función supresora.

Por lo tanto, se puede concluir que los patrones moleculares asociados a patógenos luminales son importantes en el desarrollo de LT reguladores en el intestino y en la supresión de la inflamación crónica en respuesta a la flora comensal.

Recientes investigaciones han demostrado que la inflamación tiene un rol clave en la enfermedad coronaria y otras manifestaciones de aterosclerosis. Se ha visto que las células del SI dominan las lesiones ateroscleróticas (ATE) iniciales y sus moléculas efectoras aceleran la progresión de la enfermedad, y la activación e inflamación pueden desencadenar un síndrome coronario agudo. Es aquí donde juega un rol clave el monocito, el cual entra a la placa ATE y se diferencia al macrófago; esto es crítico en el desarrollo de la ATE y se asocia con un aumento en la expresión en superficie de RTT. Estos RTT al reconocer los patrones moleculares de los patógenos inician una cascada de señales que llevan a la activación celular. El macrófago activado produce citoquinas inflamatorias, proteasas, radicales libres de oxígeno, los cuales están involucrados en la patogenia de la ATE. Esto mismo ocurre en las CD, mastocitos y células endoteliales, que también expresan RTT. El futuro de muchas de las enfermedades autoinmunes depende del descubrimiento de drogas capaces de bloquear la activación continua del SI, y una de las posibilidades sería el bloqueo de la activación de los RTT, lo cual está aún en desarrollo.

BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA

- Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll like Receptors. Annu Rev Immunol 2003; 21:335-376.
- Abbas A y Lichtman A. Inmunidad Innata en Inmunología celular y molecular. 5ª Edición 2004. Editorial Elsevier España.
- Goldstein D. Toll like Receptors and other links between innate and acquired alloimmunity. Curr Op Immunol 2004; 16:538-544.
- Dabbagh K y Lewis D. Toll like receptors and Th1/Th2 response. Curr Op Infect Dis 2003; 16:199-204.
- Pasare Ch y Medzhihov R. Toll like receptors: balancing host resistance with immune tolerance. Curr Op Immunol 2003; 15:677-682.
- Takeda K y Akira S. TLR signalling pathways. Seminars in Immunology 2004; 16:3-9.
- Abreu M. Immunologic regulation of TLR in gut epithelium. Curr Op Gastroenterol 2003; 19:559-564.
- Sanchez E y Orozco G. TLR and human pathology. Inmunología 2004; 23(4):328-338.
- Seibl R, Kyburz D et al. Pattern recognition receptors and their involvement in the pathogenia of Arthritis. Curr Op Rheumatol 2004; 16:411-418.
- Peng S. Signalling in B cells via TLR. Curr Op Immunol 2005; 17:1-7.
- Ospelt C, Kyburz D et al. Toll like receptors in rheumatoid arthritis joint destruction mediated by two distinct pathways. Ann Rheum Dis 2004; 63(Suppl II): ii90-ii91.
- O'Neil L. Therapeutic targeting of TLR for inflammatory and infectious disease. Curr Op Pharmacol 2003; 31:396-403.