

## TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS MEDIANTE INMUNOMODULACIÓN DE LOS TOLL LIKE RECEPTORS.

Jesús Ruiz Contreras. Sección de Lactantes e Inmunodeficiencias.

Departamento de Pediatría. Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid

### Introducción

El sistema inmune consta de dos componentes fundamentales, la inmunidad innata y la inmunidad adaptiva, ambos con funciones diferentes, pero complementarias.

La inmunidad adaptiva descansa en la función de los linfocitos B y T y se desarrolla después del contacto con el patógeno. Cada una de estas células posee un receptor específico capaz de reconocer a un antígeno concreto. La diversidad de estos receptores (repertorio) es tan grande que asegura que existirá un clon de linfocitos T o B que reconocerá a cualquier antígeno potencial. La gran variedad de receptores específicos se genera durante el desarrollo de las células B y T, mediante un proceso al azar, denominado reordenamiento genético, en el que diferentes segmentos del DNA que codifica las regiones de las inmunoglobulinas (o del receptor TRC de la célula T) se combinan de múltiples formas diferentes para dar lugar a miles de receptores,  $10^{14}$  en el caso de las inmunoglobulinas y  $10^{18}$  de receptores de la célula <sup>1</sup>.

Cuando uno de estos clones reconoce a un antígeno específico, secreta diferentes linfoquinas y expresa receptores en su membrana, lo que condiciona la proliferación de ese clon concreto (expansión clonal). Esta forma de reconocimiento y de respuesta determina una propiedad fundamental de la inmunidad adaptativa: **la especificidad**. Además, cuando en el reconocimiento de un antígeno interviene la célula T se desarrollan células de la memoria que permanecen viables durante largos periodos de tiempo e incluso durante toda la vida, y que ante un ulterior contacto con el antígeno desarrollan respuesta inmunes secundarias, mucho más rápidas y efectivas que las respuestas primarias <sup>2,3</sup>. La **memoria inmunológica** es la segunda propiedad primordial de la inmunidad adaptativa. La especificidad y la memoria inmune son el fundamento de las vacunas <sup>4,5</sup>. La inmunidad adaptativa tarda 3 a 5 días en desarrollarse una vez que ocurre el contacto con el patógeno.

La inmunidad innata es anterior en la evolución a la inmunidad adaptativa, está presente en todos los organismos multicelulares y se activa en unas pocas horas, una vez que el patógeno entra en contacto con el sistema inmune <sup>1</sup>. Los componentes de la inmunidad innata son: las células presentadoras de Ag (CPA) como los macrófagos y las células dendríticas, los neutrófilos, el complemento y los reactantes de fase aguda, como la proteína C reactiva (PCR). A diferencia de la inmunidad adaptativa, la inmunidad innata no reconoce antígenos inespecíficos, sino estructuras moleculares altamente conservadas (polisacáridos, peptidoglicanos, etc), denominadas patrones moleculares asociados a los patógenos (PAMPs), que aparecen en diferentes grupos de microorganismos. Los PAMPs son esenciales para la supervivencia del microorganismo y no aparecen en las células del huésped. Entre los PAMPs más importantes se cuentan los lipopolisacáridos bacterianos, el peptidoglicano, el ácido lipoteicoico, los mananos. El DNA bacteriano y el RNA de doble cadena<sup>1</sup>.

Los receptores que reconocen los PAMPs son de 4 tipos<sup>1</sup>: receptores de señal, que son glicoproteínas transmembrana de las células presentadoras de Ag (CPA) con dominios extracelulares ricos en leucina (toll like receptors o TLR) y que reconocen los microbios en la superficie celular y en los endosomas <sup>6</sup>; receptores que se secretan al plasma como las lectinas que se unen a los mananos de las bacterias; receptores endocíticos que se encuentran en la membrana de la CPA y que median la fagocitosis de la bacteria, como es el receptor de la manosa; y los receptores NOD like receptors (NLR), NOD1 y NOD2, que reconocen a los patógenos intracelulares en el citosol <sup>6,7</sup>.

La inmunidad innata y la inmunidad adaptativa están estrechamente relacionadas <sup>1,8</sup>. Por una parte la activación de las CPA tras el reconocimiento antigénico por los TLR induce moléculas coestimuladoras. Por otra, la célula CPA digiere al patógeno fagocitado a través de los receptores endocíticos, y en el fagosoma elabora un péptido que es presentado en el contexto de los MCH de clase II a la célula T. La consecuencia final es la activación y expansión clonal de la célula T.

### **Los Toll like receptors of TLRs**

El gen toll es un gen, descubierto por Kathryn Anderson, que controla la polaridad dorsoventral de las larvas de la mosca de la fruta la fruta *Drosophila*

*melanogaster*. Años después de su descubrimiento, se conoció que el gen toll era el responsable de la resistencia frente a la infección por hongos en la *Drosophila* <sup>9</sup>. Más tarde, en 1997, Medzhitov describió en las personas una proteína, parecida a la proteína toll (Toll like receptor) de la *Drosophila*, capaz de transmitir una señal de activación en las CPA, de forma similar al receptor de la IL-1, a través de la vía NFκB <sup>10</sup>.

Actualmente, se conocen 12 TLRs. Éstos son proteínas transmembrana que contienen un dominio extracelular rico en leucina (LRR) y un dominio intracelular denominado TIR (toll-interleukin-1 receptor) por su semejanza con el dominio intracelular del receptor de la IL-1. La activación de los TLRs al unirse a su ligando (los PAMPs) pone en marcha una cascada de eventos cuyo resultado final es la activación y translocación hasta el núcleo del NFκB, un potente activador transcripcional que conduce finalmente a una activación de las CPA, que segregará las linfocinas, fundamentalmente interferones y TNFα, cuya finalidad es destruir al patógeno. Al mismo tiempo, la activación de los TLR induce en la CPA moléculas coestimuladoras, como D40, CD80 y CD86, que activan a la célula T. Las citoquinas secretadas inducen una diferenciación guiada de la célula T, bien hacia el desarrollo de una respuesta CD4+ T helper (TH1) o de linfocitos citotóxicos CD8+ <sup>6,11</sup>. En resumen, los TLRs tienen tres tipos de funciones: **reconocimiento del patógeno, funciones efectoras y regulación de las respuestas adaptativas.**

De manera muy genérica, los TLRs pueden dividirse en dos grandes grupos: los que reconocen estructuras bacterianas (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, y TLR6) que están localizados en la membrana celular y los que reconocen ácidos nucleicos virales y bacterianos (TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9) localizados en las membranas de los fagolisosomas <sup>6,11,12,13,14</sup>.

**Tabla 1. Ligandos de los TLRs y respuestas que desencadenan**

TLR	Localización	PAMPs a los que se une	Citoquinas que se producen y respuesta adaptativa
TLRs 1, 2 y 6	Membrana celular	Lipoproteínas Peptidoglicanos Zimosan	IL-10 Respuesta Th1

		Acido lipoteicoico	
TLR 4	Membrana celular	LPS (endotoxina) VRS	IL-12, IF $\alpha$ Respuesta Th1
TLR5	Membrana celular	Flagelina	IL-12 Respuesta Th1
TIR11	Membrana celular	Profilina de <i>Toxoplasma gondii</i>	IL-12 Respuesta Th1
TLR 3	Membrana del endosoma	RNA de doble cadena	IL-12, IF $\alpha$ Respuesta Th1
TLR 7 y 8	Membrana del fagolisosoma	RNA de cadena simple	IF $\alpha$ Respuesta Th1
TLR 9	Membrana del fagolisosoma	CpG DNA (oligonucleótidos metilados)	IF $\alpha$ Respuesta Th1

Hay diferentes células dendríticas que, preferencialmente, expresan algunos de estos receptores. Por ejemplo, los TLRs 7, 8 y 9 son expresados fundamentalmente por las llamadas células dendríticas plasmacitoides mientras que el resto de TLRs lo son por las células dendríticas mieloides <sup>8, 11, 12</sup>.

El conocimiento de las funciones de los TLRs y sus vías de activación ha abierto numerosas posibilidades para el tratamiento del cáncer, las enfermedades alérgicas y autoinmunes y las enfermedades infecciosas, especialmente por virus y microorganismos intracelulares <sup>11,15</sup>, aunque la mayoría de estudios en este campo se están realizando en animales o son ensayos humanos en fase I y II.

El factor de diferenciación mieloide (MyD88) es una proteína citosólica que forma parte de la vía de señalización de todos los TLRs excepto el TLR3. La letalidad en los ratones carentes de MyD88 tras una peritonitis polimicrobiana inducida es mucho menor que en los ratones que tienen esta proteína. La disminución de la mortalidad se relaciona con niveles menores de citoquinas

como TNF, IL-10 y IL-12 <sup>16</sup>. Así, la inhibición de esta proteína podría disminuir la mortalidad de la sepsis en humanos.

Los ratones deficientes en IRAK 4 (kinasa asociada al receptor de la interleukina 1) son resistentes a la muerte por la exposición con endotoxina. De nuevo, esta resistencia se asocia a una disminución de los niveles de citoquinas <sup>17</sup>.

La proteína transmembrana CD14 juega un papel fundamental en la activación del TLR4 cuando este se une a la endotoxina bacteriana<sup>1</sup>. El bloqueo de esta molécula mediante anticuerpos monoclonales CD14, protege frente a la muerte y daño multiorgánico a los conejos expuestos a endotoxinas <sup>18</sup>. Este mismo anticuerpo monoclonal anti-CD14 disminuye la fiebre, los niveles plasmáticos de citoquinas plasmáticas y los cambios en la tensión arterial en personas voluntarias a las que se les administra endotoxina <sup>19</sup>.

La función de los TLR3, TLR7, TLR 8 y TLR 9 en el reconocimiento de los ácidos nucleicos virales <sup>6,11,12,13,14</sup>, hace que se estén ensayando en el tratamiento de la hepatitis C, herpes genital, e infecciones por papilomavirus.

El TLR reconoce dinucleótidos CpG no metilados que son frecuentes en los genomas virales y bacterianos, pero infrecuentes en los genomas de los vertebrados donde estos nucleótidos tienen un alto grado de metilación. La activación del TLR 9, presente sobre todo en las células dendríticas plasmacitoides, por los CpG induce fuertes respuestas Th1 con producción de interferón tipo I, activación de células NK y respuestas citotóxicas CD8+ <sup>6, 11, 12, 13, 14, 20, 21</sup>, y el uso de oligodeoxinucleótidos CPG para activar esta vía ha demostrado que proporciona protección frente a micobacterias, parásitos, hongos y virus en animales <sup>20, 21</sup>.

Particularmente importante es el uso de los CpG como adyuvantes de vacunas <sup>11, 20, 21, 22</sup>. Se ha estimado que los CpG potencian la respuesta de la vacuna entre 10 y 1.000 veces cuando se combina con diferentes antígenos administrados por diferentes vías. La actuación sobre la inmunidad innata utilizando las diferentes vías de los TLR permite obtener las respuestas deseadas de tipo Th1 o Th2, dependiendo del patógeno frente al cual se quiere lograr la protección. Además, mediante la misma aproximación se puede aumentar la expansión clonal de los linfocitos T o incrementar la memoria inmunológica<sup>23</sup>.

El uso de los CpG plantea algunas inquietudes acerca de su seguridad. Se ha postulado que la activación del TLR 9 podría dar lugar a fenómenos autoinmunes al desencadenar una elevada secreción de citoquinas proinflamatorias <sup>20,21</sup>. En ratones en los que se administra CpG se producen fenómenos autoinmunes y síndromes parecidos al shock tóxico. Sin embargo, esto no ocurre en primates ni en los casos en los que se ha administrado a personas. La diferente toxicidad puede radicar en que el TLR9 se expresa en los ratones en muchas más células inmunes que en los primates, por lo que los niveles de citoquinas tras la activación son notablemente mayores en los primeros <sup>20,21</sup>.

### **Heat shock-proteins**

Las heat-shock proteins son proteínas altamente conservadas a lo largo de la evolución, que se expresan en todas las células, y que funcionan como chaperonas (proteínas que contribuyen al plegado de otras proteínas) tanto en condiciones fisiológicas como de estrés <sup>24</sup>. Se han descrito varias familias de HSP: HSP 90, HSP 70, HPS 60 y la HSH (small heat shock). Estas proteínas son necesarias en todos los seres vivos para adaptarse a todas las circunstancias de estrés (frío, calor, cambios de ambiente, cambios iónicos, estrés oxidativo, etcétera). Sus funciones fundamentales son: pliegue de proteínas, prevención de la agregación de las proteínas, renaturalización de proteínas desnaturalizadas y degradación de las mismas cuando su renaturalización no es posible. Cuando los microorganismos infectan a un ser vivo, se genera una situación de estrés para aquéllos, con la consiguiente expresión de HSPs para asegurar su adaptación y supervivencia. La inhibición mediante anticuerpos monoclonales de esas HSPs puede ayudar a la destrucción del microorganismo y al control de la infección. En un trabajo reciente, la administración de un anticuerpo monoclonal recombinante contra la HPS 90 de la pared de los hongos, asociada a la anfotericina B, produjo una mejoría clínica y microbiológica en un mayor número de pacientes que en los tratados sólo con anfotericina <sup>25</sup>.

Es posible que los nuevos tratamientos, cuando prácticamente se ha tocado techo con el tratamiento antibiótico, nos lleven, como ha sido expresado, a la tercera edad del tratamiento antimicrobiano <sup>26</sup>

## BIBLIOGRAFIA

1. Medzhitov R, Janeway c. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000; 343: 338-343.
2. Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 1996; 272: 54-60.
3. Sprent J, Tough D. Lymphocyte life-span and memory. *Science* 1994; 265: 1395-1400.
4. Nossal GJV. Host immunobiology and vaccine development. *Lancet* 1997; 350: 1316-19.
5. Beverly PCL. Vaccine immunity. *Immunol Today* 1997; 18: 413-415.
6. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801.
7. Kanneganti TD, Lamkanfi M, Núñez G. Intracellular NOD like receptors in host defence an disease. *Immun Rev* 2007; 27: 549-559.
8. Pulendran B, Ahmed R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell* 2006; 124: 849-863.
9. Leimatre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhar JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/catus control the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86: 973-983.
10. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* toll protein signals activation of adaptative immunity. *Nature* 1997; 388: 394-397.
11. Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. Therapeutic targeting of innate immunity with toll-like receptor agonist and antagonist. *Nature Med* 2007; 13: 552-559.
12. Ueno H, Klechevsky E, Morita R, Aspod C, Cao T, Matsui T, et al. Dendritic cell subsets in health an disease. *Immunol Rev* 2007;219: 118-142.
13. Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nature Immunol* 2006; 7: 131-137.
14. Kabelizt D, Medzhitov R. Innate immunity-cross-talk with adaptative immunity trough pattern recognition receptors and cytokines. *Curr Op Immunol* 2007; 19: 1-3.
15. Lawton JA, Ghost P. Novel therapeutic strategies based on toll-like receptor signaling . *Curr Op Chem Biol* 2003; 7: 446-451.
16. Weighard H, Kaiser-Moore S, Vabulas RM, Kirschning CJ, Wagner H, Holzmann B. Cutting edge: myeloid differentiation factor 88 deficiency improves resistance against sepsis caused by polymicrobial infection. *J Immunol* 2002; 169: 2823-2827.

17. Suzuki H, Suzuki S, Duncan GS, Millar DG, Wada T, Mirtsos C, et al. Severe Impairment of interleukin-1 and toll-like receptor signaling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 2002; 416: 750-754.
18. Schimke J, Mathison J, Morgiewicz J, Ulevitch RJ- Anti-CD14 mAb treatment provides therapeutic benefit after *in vivo* exposure to endotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13875-13880.
19. Lynn M, Rossignol D, Wheeler JL, Kao RJ, Perdomo CA, Noveck R, et al. Blocking of Responses to endotoxin by E5564 in Healthy Volunteers with Experimental Endotoxemia. *J Infect Dis* 2003; 187: 631-639.
20. Krieg AM. Antiinfective applications of toll-like receptor 9 agonists. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4: 289-294.
21. Klinman DM. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nature Rev Immunol* 2004; 4: 1-10
22. Stevenson FK. DNA vaccines and adjuvants. *Immunol Rev* 2004; 199: 5-8.
23. Pulendran B, Ahmed R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell* 2006; 124: 849-863.
24. Prohaszka Z, Füst G. Immunological aspects of heat-shock proteins –the optimum stress of life. *Molec Immunol* 2004; 41: 29-44.
25. Pachi J, Svoboda P, Jacobs F, Koenraad V, Van der Hoven B, Spronk P, et al. A randomized, blinded, multicenter trial of lipid-associated amphotericin B alone versus in combination with an antibody-based inhibitor of heat shock protein 90 in patients with invasive candidiasis. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 1404-13.
26. Casadevall. The third age of antimicrobial therapy. *Clin infect Dis* 2006; 42: 1414-16.