

REVISIÓN - ACTUALIZACIÓN

Los receptores tipo Toll y su papel en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias

Mauricio de Castro Pretelt¹, Elías Forero Illera²

Omnia mutantur, nihil interit.

Resumen

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad crónica de etiología desconocida. Aunque varias explicaciones han sido propuestas con el fin de esclarecer su causa, ninguna ha tenido éxito total. La hipótesis infecciosa, en la cual la AR estaría iniciada y perpetuada por la respuesta del sistema inmune ante el estímulo de un agente infeccioso, es una de las más invocadas; los hallazgos en el tejido sinovial pueden ser producidos por estos, pero el agente causal no se ha podido demostrar.

La identificación de unas proteínas de membrana puede ofrecer una base plausible a esta hipótesis. Los toll-like receptors son proteínas de membrana que están encargadas de la identificación de algunos patógenos. Estos receptores juegan un papel muy importante en la respuesta inmune, siendo capaces de reconocer agentes infecciosos, iniciar la respuesta inmune mediante una compleja cascada de señalización intracelular, y luego, servir de puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adquirida. El estímulo de estos receptores por un patógeno dado puede generar una reacción inflamatoria que se perpetúa en un huésped genéticamente susceptible.

Palabras clave: toll-like receptors, señalización intracelular, artritis reumatoide, NF- κ B.

Summary

Rheumatoid arthritis is a chronic disease of unknown etiology. Although various explanations have been proposed as to establish its cause, none has succeeded, one of these theories corresponds to the infectious hypothesis, in which, RA could be initiated and perpetuated by the immune system response to and infectious agent.

In the midst of the debate arises a plausible answer to explain this hypothesis.

Toll-like receptors are membrane proteins, in charge of the identification of certain pathogens. These receptors play an important role in the immune response, being capable of reconnaissance of infectious agents, initiation of the immunological response by means of a complex intracellular signaling cascade, and then, to serve as a bridge between innate immunity and acquired immunity.

Key words: toll-like receptors, intracellular signaling, rheumatoid arthritis, NF- κ B.

1 Médico Interno, Hospital de la Universidad del Norte.

2 Médico Internista Reumatólogo, Hospital de la Universidad del Norte.

Recibido para publicación: abril 30/2004.

Aceptado en forma revisada: julio 25/2004.

La artritis reumatoide es una enfermedad crónica, de carácter progresivo, destructiva, de etiología desconocida, multifactorial y poligénica¹. Se postula la presencia de un antígeno inespecífico, que desencadena un proceso inflamatorio multicompartimental, en un individuo genéticamente susceptible, en el cual participan factores humorales y celulares, generando un proceso de activación inmunológica, que induce producción aberrante de citoquinas y que finalmente lleva a un trastorno de regulación celular.

Se sabe con certeza que el establecimiento de una fase crónica inflamatoria de la enfermedad comienza con el compromiso de las células sinoviales. Estas producen citoquinas y quimoquinas, como el factor 1 derivado de las células estromales que atrae linfocitos y monocitos dentro de la articulación. Si existe un reconocimiento antigénico en el tejido articular comienza la inflamación². Dentro de este ambiente tóxico el fenotipo del linfocito T es alterado, sin embargo, no se sabe si inicia el proceso inflamatorio. Numerosas teorías han sido postuladas, cada una ha tenido su época de auge según el contexto histórico-científico en el cual han estado situadas. El advenimiento de las técnicas de biología molecular ha volcado la atención hacia un mejor entendimiento del mecanismo fisiopatológico celular y algunas teorías están ganando importancia gracias a estos estudios.

La identificación de *Borrelia burgdorferi* como el agente causal de la enfermedad de Lyme, una enfermedad con manifestaciones articulares de la que se desconocía su etiología, y la identificación de antígenos microbianos en la membrana sinovial de los pacientes con artritis reactiva, plantean una perspectiva para la búsqueda de microorganismos causales de algunas enfermedades autoinmunes³. Se podrían postular dos hipótesis para explicar el papel que desempeñaría un agente infeccioso en la etiología de la AR:

1. El microorganismo X induce daño tisular y un proceso inflamatorio crónico estimulado por una infección persistente.
2. El agente X se presenta al inicio de la enfermedad y posteriormente es depurado por el sistema inmune, con persistencia de la inflamación.

Desde hace más de 50 años se está a la caza de un microorganismo infeccioso como causante de la AR, se han realizado numerosos estudios con el fin de establecer un agente causal. Con el pasar del tiempo, el desarrollo de la tecnología y el perfeccionamiento de la técnica se han desarrollado varios métodos y procedimientos, cada uno más sofisticado que el anterior, con el propósito de encontrar al culpable, pero realmente no se ha tenido éxito; sin embargo, varios organismos se han visto implicados en algún punto como agentes etiológicos, a saber: mycobacterias, micoplasmas, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, parvovirus, y el siempre presente virus de Epstein-Barr. Inclusive se han realizado pruebas para detectar organismos no descritos aún, como por ejemplo: buscando actividad enzimática no eucariota o regiones bacterianas fuertemente conservadas como los genes ribosomales 16s³.

Grandes esfuerzos se están realizando para demostrar un agente causal de la AR, sin resultados contundentes.

¿Podría en algún momento estar relacionada la AR con un agente infeccioso?

El devenir histórico del hombre a través de los siglos no ha sido un simple pasar estático de los años, todo lo contrario, ha entrañado desde el inicio de los tiempos la continua adaptación del hombre al medio ambiente que lo rodea, con el fin de asegurar su supervivencia y continuidad en un medio hostil y amenazante. Esto requirió de la inversión de tiempo y energía en el aprendizaje de nuevas habilidades y destrezas con el fin de lograr una mejor adaptación. Simultáneo a este cambio externo se forjaba otro, uno interno, un cambio no tan evidente, ya que el hombre se encontraba en la necesidad de desarrollar un sistema de protección contra huéspedes no invitados, algo que lo protegiera del enemigo invisible, de aquello que no podía ver pero que, sin embargo, era patente a través de las enfermedades que le afectaban, era necesario algún sistema de defensa inherente a él. El inexorable paso del tiempo llevó al hombre desde primate hasta ser superior en la escala evolutiva y el notorio desarrollo externo del hombre tuvo su contraparte interna, hubo un crecimiento

paralelo entre estas dos partes, este sistema inmune primitivo del hombre lo acompaña desde su más tierna infancia y permanece con él hasta ahora, no el mismo de antes sino más fuerte, más avanzado, más eficiente, aun así conserva la estructura elemental que tan bien le ha funcionado, algunas cosas nunca cambian...

A través de su evolución los diferentes microorganismos patógenos para el ser humano han conservado algunas secuencias importantes para su supervivencia, secuencias que determinan estructura y función; éstas están sometidas a tasas muy bajas de mutaciones debido a su gran importancia para la auto conservación y, por lo tanto, se encuentran altamente conservadas. El sistema inmune humano ha tenido en cuenta este sistema y se ha aprovechado de la situación tomando estas secuencias como moléculas de reconocimiento, las cuales han sido llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP); entre ellos se encuentran: el lípido A del polisacárido de las bacterias gram negativas, ácido teicoico para las bacterias gram positivas, lipoarabinomano para mycobacterias, peptidoglicano y DNA bacteriano para otras bacterias, mananos para hongos, así como secuencias específicas para espiroquetas.

A su vez el sistema inmune innato representado por los macrófagos, células endoteliales, células epiteliales y células presentadoras de antígenos, guardan dentro de su estructura proteínas tanto solubles como de superficie que cumplen la función de moléculas complementarias para los PMAP, las cuales llevan el nombre de receptores de reconocimiento de patrones (RRP), entre los cuales están bien caracterizadas algunas como el CD14, las integrinas $\beta 2$, lectinas tipo C y receptores de complemento, entre otras⁴.

Desde hace aproximadamente diez años se conoce una familia de receptores asociados estrechamente con la respuesta inflamatoria, los cuales fueron descritos inicialmente en estudios realizados en la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster*. Estos estudios describían una familia de proteínas estrechamente relacionadas, que reconocían patógenos particulares activando la cascada de la inflamación de una manera altamente específica. Gracias a estudios realizados por genética y biolo-

gía comparativa se extrapolaron estas investigaciones a seres humanos con el fin de determinar la conservación de estas proteínas en especies superiores y verificar si cumplían con la misma función. Los esfuerzos dieron resultados, y hoy se sabe que los toll-like receptors (TLR) descritos inicialmente en *Drosophila* existen en formas homólogas en seres humanos, se conoce de su existencia en todos los reinos, desde insectos y plantas hasta mamíferos superiores, con una homología sorprendentemente conservada. Varios estudios han dilucidado la estructura génica de diez receptores en humanos, cinco más están en camino, de estos, cinco receptores han sido estudiados a fondo (TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6 y TLR-9). Los TLR hacen parte del sistema RRP y su importancia radica en su capacidad para reconocer patógenos, a diferencia de las otras moléculas mencionadas previamente. Consistentes con su papel de reconocimiento de moléculas foráneas del sistema inmune innato, estos TLR se encuentran ampliamente distribuidos en las diferentes células que podrían en algún momento servir de puerta de entrada o estar en contacto con los diferentes patógenos, tales como: monocitos/macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células epiteliales intestinales y células endoteliales; también se han encontrado TLR-2 y TLR-4 en linfocitos B y T, pudiendo estar en algún momento relacionadas con la respuesta inmune adaptativa⁵.

Información detallada acerca de cómo se activan y funcionan realmente los TLR se obtuvo en estudios de la cascada inflamatoria y su activación en relación con algunos antígenos específicos en el contexto de shock séptico por gram negativos. En estos experimentos se descubrió que el TLR-4 es específico para el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias gram negativas. Este último se une a un receptor soluble específico llamado LBP (lipopolysaccharide binding protein o proteína ligadora de lipopolisacárido), el cual cumple la función de opsonina, amplificando la señal. Este complejo LPS-LBP se une a un receptor de superficie, el cual no tiene la capacidad de traducir la señal al interior de la célula pero sí inicia la cascada de activación, este es el CD14. Este CD14 necesita de co-receptores para llevar a cabo la respuesta elicitada, estos receptores son: el TLR-4, que inicia consecuentemente la vía de activación inflamatoria, y el MD-2, que parece jugar un

papel “sensibilizador” al LPS. Con respecto al TLR-2, el cual está asociado al reconocimiento de bacterias grampositivas, hongos y protozoos, este no parece estar asociado a proteínas tales como el CD14, aunque el resultado es el mismo: la activación de la respuesta inflamatoria. Todo este proceso sucede en la parte externa de la membrana citoplasmática y comprende la primera parte del proceso, posteriormente se produce la activación de una cascada de señalización intracelular compleja en la cual se ven implicadas múltiples proteínas. La caracterización de esta vía de señalización vino dada por estudios comparativos de estructura cristalográfica de proteínas, los cuales mostraron un alta similitud con la superfamilia de los receptores de la interleuquina tipo 1 (IL-1R), los cuales poseen un ectodominio altamente conservado compuesto por regiones ricas en leucina, presente también en el dominio intracitoplasmático de los TLR. A este complejo se le denominó TIR (toll/interleukin receptor), por ende se concluyó que su vía de señalización intra citoplasmática debía ser muy similar⁶.

La vía de activación de los receptores tipo Toll es muy similar a la de la IL-1, por lo tanto, se sabe que la activación final depende de proteínas de señalización compartidas, en la cual el estímulo inicial produce la activación del receptor de superficie, e.g: el lípido A del LPS produce activación del TLR-2 que a su vez produce activación de Myd88 (factor diferenciador mieloides 88), el cual asociado a IRAK (quinasa asociada al receptor de IL-1) activa a la proteína TRAF-6 (factor asociado al receptor de TNF), las cuales inducen varias IKK's produciendo la fosforilación de IκB con la consecuente liberación del NF-κβ y la transcripción de citoquinas pro inflamatorias, como la IL-1, IL-12 y el TNF-α, como puede apreciarse en la figura 1⁷.

Otras proteínas, como las quinasas de proteínas activadas por mitosis (MAPK), el factor nuclear Kappa-Beta (NF-κβ) y las quinasas de Janus/traductor de señal y activador de transcripción (JAK/STAT), juegan un papel importante en la regulación de la activación de las citoquinas por parte de los TLR y en la perpetuación de la respuesta inmune. Todas estas moléculas están implicadas en la patogénesis de la AR⁸.

Quinasas de proteínas activadas por mitosis (MAPK)

Incluye una serie de quinasas de proteínas que se encargan de controlar la proliferación celular, supervivencia, generación de citoquinas y producción de metaloproteinasas. Se dividen en tres familias: p38MAPK, quinasa c-Jun N-terminal (JNK) y quinasa extracelular asociada a señales (ERK). De estas p38MAPK parece ser la más importante en relación con el control de citoquinas del macrófago y se ha visto su expresión aumentada en el líquido sinovial de paciente con AR, y lo que es aun más, los inhibidores del p38 producen una disminución notable en la inflamación².

Factor nuclear- κβ (NF- κβ)

Es un factor de transcripción que participa en inmunidad e inflamación, normalmente está unido en el citoplasma a IκB. Estrés, citoquinas inflamatorias y productos microbianos resultan en la fosforilación de IκB por parte de la quinasa IKB (IKK), con la consecuente translocación del NF-κβ al núcleo y la consecuente transcripción génica, como puede ser apreciado en la figura 1. El NF-κβ se encuentra presente en todas las células, pero existe una sobreexpresión en los pacientes con AR, debido a la estimulación producida por el TNF-α y la IL-1 a los fibroblastos sinoviales, lo que se traduce en una producción elevada del IKK⁸.

La vía JAK/STAT

Desde hace mucho tiempo se conocen la importancia de las quinasas de Janus (JAK) y del transductor de señal y activador de la transcripción (STAT) en la regulación de la expresión de citoquinas. JAK es reclutado y activado por acoplamiento de receptores de membrana, seguido de la fosforilación y translocación de STAT dentro del núcleo donde actúa como factor de transcripción. Una de las respuestas de la señalización mediada por JAK/STAT es de crucial importancia para la mediación de la respuesta inflamatoria; se ha observado que la vía JAK/STAT3, iniciada por la IL-6, actúa activando a los supresores de señalización de citoquinas (SOCS), las cuales funcionan como un mecanismo contra regu-

lador, ya que la ausencia de su expresión en ratones modificados genéticamente producía en ellos enfermedades severas articulares, y además se ha visto implicado en la regulación de artritis inflamatoria aguda y en la activación de linfocitos T CD4⁺ 2, 4.

Sobre este presupuesto teórico, en síntesis, se sabe que la reacción inflamatoria inducida por los TLR en respuesta a un estímulo es consecuencia de la activación de varios grupos de sustancias. Se liberan tres grupos principales de mediadores luego de la activación de los factores de transcripción, estos son:

1. El primer grupo conformado por especies intermedias tóxicas de oxígeno y nitrógeno, y varios péptidos con actividad microbicida amplia, que forman una primera línea no específica de defensa inmediata.
2. El segundo grupo. Lo constituyen reactantes de fase aguda y citoquinas pro inflamatorias.
3. El tercer grupo. Conformado por moléculas que señalizan para la activación de los linfocitos T, formándose el puente entre inmunidad innata y adaptativa, paso final en el establecimiento de la cronicidad de la respuesta inmune.

Se ha postulado que el TLR-2 es estimulado tanto por componentes bacterianos como por proteínas propias, como el TNF- α y la interleuquina-1 β , y ambas respuestas son mediadas por la vía del NF- κ B, por lo tanto, los TLR están implicados en el inicio (dado por la activación con componentes bacterianos) y en la perpetuación de la respuesta inflamatoria (dada por la activación de citoquinas inflamatorias como el TNF- α). La estimulación del TLR-2 en el fibroblasto sinovial produce regulación positiva con aumento significativo en la expresión de genes que codifican para quimoquinas. Más aún, estudios por análisis cuantitativo en tiempo real de reacción en cadena de la polimerasa, en fibroblastos estimula-

dos por peptidoglicano, han detectado incremento en la regulación de algunas proteínas pro inflamatorias como las quimiotácticas de granulocitos (GCP)-2, RANTES, proteína quimiotáctica de monocitos (MCP)-2, IL-8, proteína inflamatoria del macrófago 1 α , y, en menor medida, de MCP-1, CXCL-1. En por lo menos dos estudios se ha demostrado que la activación de los TLR, con la consecuente activación de la cascada inflamatoria, produce infiltrados muy parecidos a los que tanto caracterizan a los encontrados en pacientes con AR^{2, 4, 5}.

La etiología de la artritis reumatoide continúa siendo un misterio para los investigadores básicos, sin embargo, el descubrimiento de los toll-like receptors puede contribuir al esclarecimiento de la teoría infecciosa y su efecto disparador de una respuesta inflamatoria cronicada en un huésped susceptible.

Referencias

1. Iglesias A, Forero E. Patogénesis de la Artritis Reumatoide. En Artritis Reumatoide Anaya J, Ramírez A. Editorial pág.
2. Pierer M, Rethage J, Seibl R, Lauener R, Brentano F, Wagner U *et al.* Chemokine Secretion of Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts Stimulated by Toll-Like Receptor 2 Ligands. *The Journal of Immunology* 2004; 172: 1256-1265.
3. Carty SM, Snowden N, Silman AJ. Should Infection Still Be Considered as the Most Likely Triggering Factor for Rheumatoid Arthritis?.
4. Susan E. Sweeney SE., Fireste G.S. Signal transduction in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16: 231- 237.
5. Jones BW, Heldwein KA, Means TK, Saukkonen JJ, Fenton MJ. Differential roles of Toll-like receptors in the elicitation of proinflammatory responses by macrophages. *Ann Rheum Dis* 2001; 60(Suppl 3): iii6-iii12 (November).
6. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000; 406: 782-787.
7. Seibl R, Birchler T, Loeliger S, Peter-Hossle J, Gay RE, Saurenmann T *et al.* Expression and Regulation of Toll-Like Receptor 2 in Rheumatoid Arthritis Synovium. *American Journal of Pathology* 2003; 162: 1221-1227.
8. Zhang G, Ghosh S. Toll-like receptor-mediated NF- κ B activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *Clin Invest*, January 2001; 107(1): 13-19.