

# Papel de los polimorfismos genéticos de los receptores de peaje (Toll-R) en la enfermedad y en el trasplante

Zuzet Martínez-Córdova,\* Flora Calzadilla-Lugo,\* Adriana Artiles-Valor\*

## RESUMEN

La inmunidad innata es fundamental en la respuesta del hospedero ante agentes infecciosos, y los receptores de reconocimiento de patrones, como los receptores similares a Toll (TLRs), son claves en la activación y regulación de esta respuesta inmune. La función de los receptores Toll ha sido investigada en numerosas enfermedades, comparando su incidencia entre individuos con diferentes polimorfismos genéticos, lo que sugiere que esas variaciones podrían estar asociadas con la susceptibilidad a determinadas enfermedades. En esta revisión se hace referencia a varios estudios relacionados con determinados polimorfismos en los receptores Toll y su posible efecto en enfermedades infecciosas, no-infecciosas, así como en el rechazo del trasplante y en la enfermedad del injerto *versus* hospedero. Estas investigaciones permiten profundizar en la patogénesis de muchas enfermedades, en la cascada de eventos implicados en el rechazo del trasplante, en la enfermedad injerto *versus* hospedero, así como en el desarrollo de nuevos productos terapéuticos y la individualización del tratamiento.

**Palabras clave:** Receptores similares a Toll, receptores de reconocimiento de patógenos, enfermedad del injerto *versus* hospedero.

## INTRODUCCIÓN

La respuesta inmune innata en vertebrados es la primera línea de defensa contra diversos agentes infecciosos. El sistema inmune innato es capaz de detectar estructuras moleculares que son únicas en los microorganismos,<sup>1</sup> y son llamadas patrones de reconocimiento.

\* Departamento de Genética Molecular, Hospital "Hermanos Ameijeiras", Ciudad de La Habana, Cuba.

### Correspondencia:

MSc Zuzet Martínez Córdova  
San Lázaro Núm. 701, Esquina a Belascoaín. Centro Habana, Ciudad de la Habana, 10700, Cuba. E-mail: zuzet.mtnez@infomed.sld.cu

Recibido: 15-04-2008

Aceptado: 26-05-2009

## ABSTRACT

*The innate immunity plays a critical role in host protection against pathogens and the pattern recognition receptors such as the Toll-like receptors (TLRs), are key mediators of the activation and regulation of this immune response. The function of TLRs in several human diseases has been investigated by comparing the incidence of disease among persons with different polymorphisms in the genes of TLRs suggesting that some of these polymorphisms are associated with susceptibility to a spectrum of diseases. In this review we summarize studies of TLRs polymorphisms in human infectious and non-infectious diseases, allograft rejection and graft versus host disease because these findings have resulted in new opportunities to study the pathogenesis of disease, the events implicated in the allograft rejection, graft versus host disease and the development of novel therapeutic products specifically tailored to individuals.*

**Key words:** Toll like receptors, pattern recognition receptors, pathogens associated molecular patterns, graft versus host disease, single nucleotide polymorphism.

Los receptores presentes en el hospedero que reconocen estas estructuras se denominan receptores de reconocimiento de patrones (PRR) y se asocian con un elevado número de moléculas que poseen motivos o patrones estructurales comunes. Las moléculas blanco de estos receptores se denominan patrones asociados a patógenos (PAMPs), aunque están presentes tanto en microorganismos patógenos como no-patógenos.

Existen numerosas clases funcionales de PRR y los que están mejor caracterizados son los llamados receptores similares a Toll (TLR). Estos receptores permiten a las células portadoras discriminar entre lo propio y lo extraño según el tipo de señal que se transmite al interior de la célula<sup>2</sup> y reconocen motivos moleculares conservados en microorganismos pero no en vertebrados. La estimulación de los TLR proporciona una respuesta defensiva mediada por péptidos antimicrobianos y citocinas.

Una serie de estudios han indicado que la genética del hospedero influye en su susceptibilidad a las infecciones,<sup>3-5</sup> ya que determinados factores genéticos influyen en la producción de citocinas por el sistema inmune innato y los individuos pueden ser clasificados según el grado de su respuesta inflamatoria.<sup>6-8</sup> Esos fenotipos inflamatorios pueden correlacionarse con la evolución clínica de los pacientes.<sup>8</sup>

Los TLR regulan tanto la respuesta inmune innata como adquirida, por lo que su función en el desarrollo de varias enfermedades ha sido arduamente investigada comparando la incidencia de la enfermedad entre personas con diferentes polimorfismos en los genes que codifican para dichos receptores;<sup>9-12</sup> estos estudios demuestran que la función de los TLR es importante en varias enfermedades, incluyendo la sepsis, inmunodeficiencias, aterosclerosis y artritis reumatoide.<sup>12-15</sup>

El objetivo de esta revisión es ilustrar la importancia de la genética de los TLR en el estudio de enfermedades infecciosas, no infecciosas, así como en el trasplante y el estudio continuado de los mismos, lo que permitirá identificar subpoblaciones de riesgo para determinadas enfermedades, profundizar en la patogénesis de numerosas enfermedades y servir de pronóstico en la evolución clínica del trasplante.

### Receptores similares a Toll (TLR)

El primer homólogo de los receptores Toll de la *Drosophila melanogaster* fue identificado en mamíferos en 1997 por Medzhitov y cols.<sup>16</sup> Estudios posteriores identificaron numerosas proteínas estructuralmente

relacionadas con este primer receptor identificado que actualmente se conocen como receptores similares a Toll (TLR).

La familia actual de TLR consta de diez miembros en humanos (TLR1 a TLR10) y doce murinos (TLR9 y TLR11 a 13) (*Cuadro I*).<sup>17</sup>

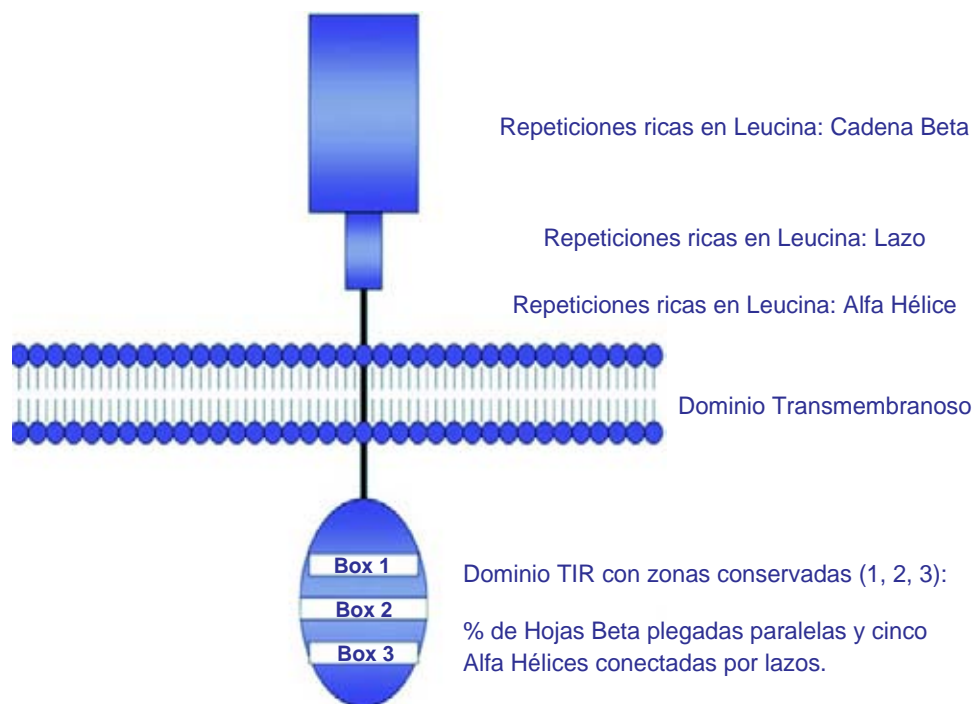
Los TLR pertenecen al tipo I de glicoproteínas integrales de membrana que se caracterizan por presentar un dominio extracelular rico en leucina (LRR) y un dominio intracelular, o citoplasmático, homólogo al receptor de la interleucina 1 (IL-1R) que posee una región conservada de 200 aminoácidos denominado dominio similar al receptor de interleucina, (Toll/IL-1) (TIR) (*Figura 1*).<sup>17,18</sup>

La homología entre los TLRs y el receptor de la interleucina 1 se limita al dominio citoplasmático pues el extracelular es marcadamente diferente. Mientras el IL-1R posee un dominio extracelular similar a las inmunoglobulinas, los TLRs contienen dominios ricos en leucina que son los responsables del reconocimiento de las PAMPs, de bacterias, virus, parásitos y hongos<sup>17,19,20</sup> (*Figura 1*). En el *cuadro I* podemos encontrar algunos de los ligandos exógenos y endógenos reconocidos por los TLR.

Aunque la mayoría de los TLRs funcionan como homodímeros, el TLR2 forma heterodímeros con los TLR1 y TLR6 y cada dímero posee una especificidad diferente. Los TLR también dependen para su función de otros correceptores como en el caso del TLR4 que requiere de una proteína (MD2) que es secretada y participa en el reconocimiento de los lipopolisacáridos de la pared bacteriana (LPS), además para facili-

**Cuadro I.** Receptores de peaje (Toll) ligandos, localización celular y especies estudiadas.<sup>17</sup>

Receptor	Ligando representativo	Tipos celulares	Localización en las células	Especies
TLR1	Triacil lipopéptidos	Macrófagos, otros tipos celulares	Superficie celular	Humana, ratón
TLR2	Peptidoglicanos	Células presentadoras de antígenos, células endoteliales	Superficie celular	Humana, ratón
TLR3	ARN de doble cadena	Células dendríticas, intestinales y epiteliales	Intracelular	Humana, ratón
TLR4	Lipopolisacáridos	Células presentadoras de antígenos	Superficie celular	Humana, ratón
TLR5	Flagelina	Epitelio intestinal basolateral	Superficie celular	Humana, ratón
TLR6	Zimosanos	Macrófagos, otros tipos celulares	Superficie celular	Humana, ratón
TLR7	ARN de cadena simple	Células presentadoras de antígenos	Intracelular	Humana, ratón
TLR8	ARN de cadena simple	No determinado	Intracelular	Humana
TLR9	CpG	Células presentadoras de antígenos	Intracelular	Humana, ratón
TLR10	No determinado	Células B	No determinado	Humana
TLR11	Profilina	No determinado	No determinado	Ratón
TLR12	No determinado	No determinado	No determinado	Ratón
TLR13	No determinado	No determinado	No determinado	Ratón



Los receptores de peaje Toll se clasifican como glicoproteínas integrales de membrana. Se observan las repeticiones ricas en leucina que están involucradas en el reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos y posteriormente en la transducción de la señal a través del TLR. El dominio citoplasmático TIR está dividido en tres zonas conservadas (box) que varían en tamaño y son críticas para la señalización, sus cadenas laterales participan en la interacción con las moléculas adaptadoras. En la figura se destacan los tipos y las zonas de localización de las estructuras secundarias.

**Figura 1.** Estructura de los receptores similares a Toll.<sup>17</sup>

tar la presentación de LPS a MD2 también participan moléculas como CD14<sup>‡</sup> (*Figura 2*).

La asociación de los TLRs con sus ligandos activan una compleja cascada de eventos que conduce a la inducción de genes proinflamatorios<sup>21-23</sup> (*Figura 2*).

Las familias de los receptores de las interleucinas 1 y los TLR comparten moléculas que participan en la transducción de la señal,<sup>23</sup> como son las moléculas adaptadoras MyD88, TICAM/TIR, TIRAP y TRAM<sup>‡</sup>,<sup>24-26</sup> las cinasas asociadas a IL-1R (IRAK), TBK1 e IKKi y el factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF6).

Las vías de señalización son diferentes para cada TLR y se han reportado fundamentales la dependiente de MyD88 y la independiente de MyD88<sup>2</sup> (*Cuadro II*). En las células dendríticas la activación de los TLR7, TLR8 y TLR9 produce la activación de una única vía de señalización dependiente de MyD88 que resulta en

la inducción del interferón (IFN) $\alpha/\beta$ . En macrófagos, la vía de activación a través de los TLR3 y TLR4 induce la producción de interferón por una vía de señalización independiente de MyD88<sup>2</sup> (*Figura 3*).

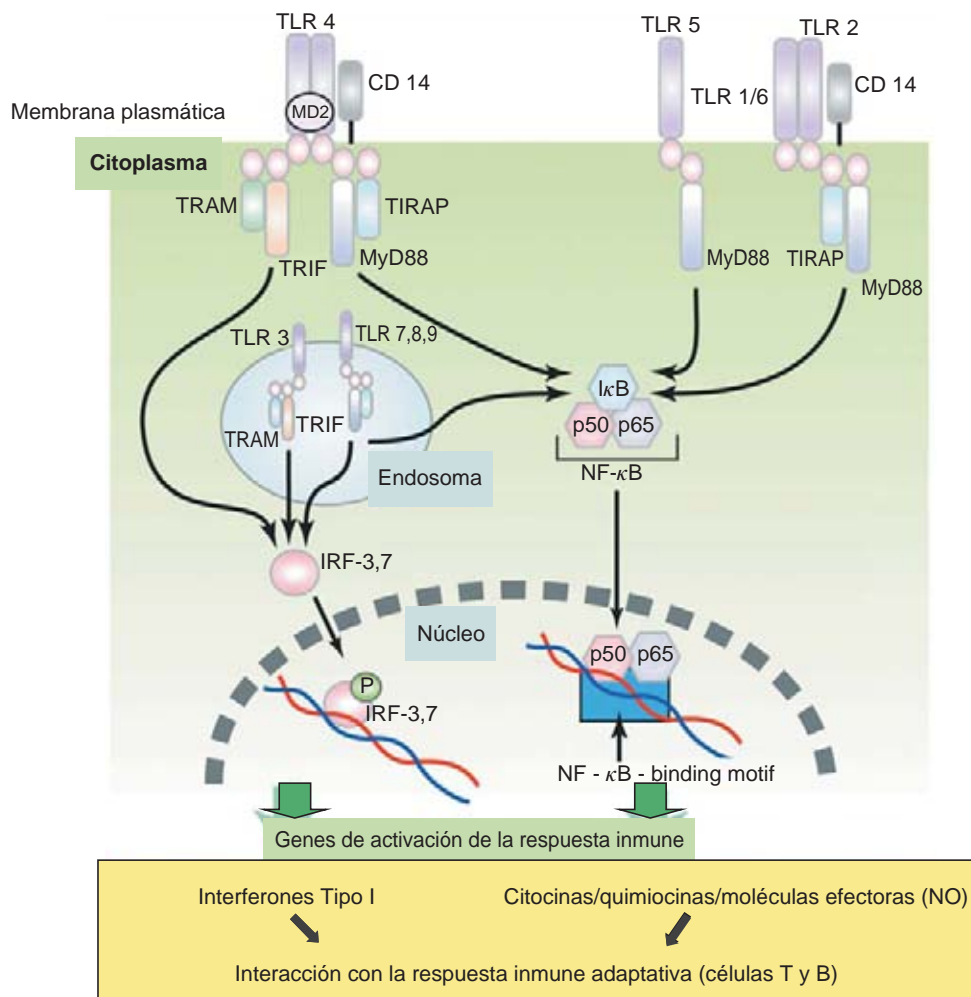
Como resultado final de la transducción de la señal se producirá la activación de los macrófagos con la subsiguiente producción de citocinas como son: el factor de necrosis tumoral, la interleucina (IL) 1B y la IL-6, que en acción coordinada producen respuestas inflamatorias locales y sistémicas. Además se producirá la activación del complemento, la opsonización del patógeno para su fagocitosis, y por lo tanto, indirectamente, los TLR desarrollan una actividad antimicrobiana. Esta respuesta antimicrobiana también puede producirse directamente a través de la producción de péptidos y proteínas antimicrobianas en los macrófagos.<sup>1</sup>

### Polimorfismos en los receptores Toll

Estudios previos de algunas inmunodeficiencias humanas primarias, asociadas con alteraciones en las vías de señalización mediadas por los TLR, demuestran que éstas son críticas en la defensa contra la infección.<sup>26,27</sup>

La susceptibilidad a las infecciones se manifiesta por herencia poligénica, donde se entrelazan de ma-

<sup>‡</sup> CD14: Cluster de diferenciación 14; MyD88: Gen 88 para la respuesta primaria de diferenciación mieloide; TICAM/TIR: Dominio TIR que contiene una molécula adaptadora; TIRAP: Dominio TIR que contiene una molécula adaptadora, TRAM: Molécula adaptadora asociada a TRIF; TRIF: Dominio TIR que contiene una molécula inductora de interferón  $\beta$ ; IRAK: Cínasa asociada al receptor interleucina 1 (IL-1R); TBK1: Proteína asociada a la enzima tirosina cinasa 1 (TAK1); IKKi: Cínasa I $\kappa$ B; TRAF: Factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TNF).



**Figura 2.** Diagrama general de los TLR y las vías de señalización.<sup>6</sup>

**Cuadro II.** Diferencia entre las vías de señalización dependiente de MyD88 e independiente de MyD88.<sup>17</sup>

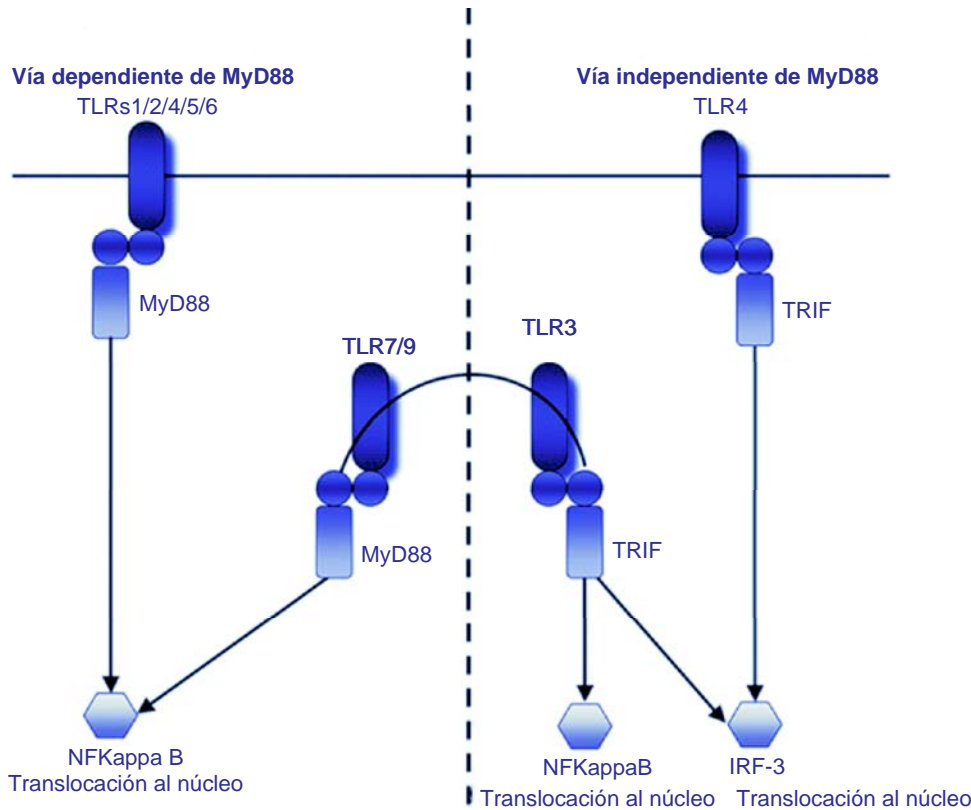
	Vía dependiente de MyD88	Vía independiente de MyD88
TLRs involucrados	TLRs 1/2/4/5/6/7/9	TLRs3/4
Molécula esencial empleada en la activación de la vía de Sustancias producidas después de la activación del factor de transcripción NFκB	MyD88	TRIF
	Todas las citocinas proinflamatorias (TNF, IL-6, etc.); estimulación en la producción de moléculas coestimuladoras	Interferón (IFN)-alpha y beta; genes inductores del IFN (CXCL10, IRG1, etc.); estimulación en la producción de moléculas coestimuladoras

nera compleja factores ambientales y genéticos.<sup>6</sup> Actualmente, gracias a las técnicas avanzadas de genotipaje y a la bioinformática, se ha facilitado la comprensión de las enfermedades con patrones de herencia complejos.

Aunque los humanos somos genómicamente idénticos, al menos en tres billones de pares de bases, se observan variaciones interindividuales aproximadamente en 3 millones de nucleótidos (0.1% del genoma).<sup>6</sup>

Como ejemplo de estas variaciones se encuentran los polimorfismos en un nucleótido (SNP) que se producen en las diferentes poblaciones con apreciable frecuencia y que implican la sustitución de una o dos bases nitrogenadas (1%).

Algunos estudios han empleado los SNP como genes candidatos para encontrar asociaciones con la susceptibilidad a diferentes enfermedades infecciosas.<sup>3,6,28-30</sup> Los estudios de este tipo más convincentes



**Figura 3.** Dos vías de señalización empleadas por los receptores similares a Toll.<sup>17</sup> Se observa la vía dependiente de la molécula adaptadora MyD88 (TLRs 1, 2, 5, 6, 7 y 9; a la izquierda) y la vía de señalización independiente de MyD88 (TLRs 3 and 4; a la derecha;) esta señal es a través de TRIF. Ambas vías producen la translocación del factor de transcripción NFKappaB del citoplasma al núcleo. Además el factor IRF3 induce la producción de interferones de tipo alfa y beta.

deben incluir un elevado número de muestras, ajustes estadísticos para comparaciones múltiples, replicación de los hallazgos en cohortes diferentes, así como detallados análisis moleculares y celulares que permitan determinar cuál de esos polimorfismos altera verdaderamente la función.<sup>6</sup> Las evidencias encontradas con relación a los diferentes TLRs se presentan a continuación.

#### *Polimorfismos en el TLR4 y su asociación con la infección*

La sepsis es un síndrome asociado con las infecciones bacterianas y causa más de 100,000 muertes cada año en Estados Unidos.<sup>30</sup> Los rasgos clínicos de la sepsis son causados, en parte, por la liberación al fluido sanguíneo de productos proinflamatorios bacterianos como los LPS.

El TLR4 es necesario en la respuesta inmune innata a LPS, o endotoxina de la pared de las bacterias gram-negativas. Este receptor tiene dos SNP no-sinónimos (D299G y T399I) con desequilibrio de ligamiento y que han sido analizados en estudios de asociación genética.<sup>6</sup>

Más de la mitad de los casos de sepsis son causados por bacterias gram-negativas, por lo que numerosos grupos han investigado las posibles asociaciones entre el polimorfismo D299G<sup>30-32</sup> y la sepsis. Dos de esos estudios demostraron que este polimorfismo incrementa el riesgo a las infecciones gram-negativas<sup>33,34</sup> y otro reporte vinculó este polimorfismo con un aumento de la incidencia del síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica.<sup>35</sup>

Es importante señalar que algunos autores han demostrado una asociación entre este polimorfismo y la susceptibilidad a la sepsis, pero este hallazgo no ha sido consistente,<sup>14,34,36</sup> quizás esto pueda deberse a que la etiología de la sepsis analizada ha sido heterogénea y a que, supuestamente, este SNP en el TLR4 sólo debe afectar la susceptibilidad a las bacterias gram-negativas. La hipótesis anterior ha sido corroborada en dos estudios;<sup>35,36</sup> sin embargo, otros no han hallado asociación entre este polimorfismo y la susceptibilidad a infecciones meningocócicas<sup>37,38</sup> o han reportado una asociación solamente en niños menores de 1 año.<sup>39</sup>

El papel protector de estos polimorfismos en el caso de la infección causada por la *Legionella pneumophi-*



la, una bacteria gram-negativa flagelada<sup>40</sup> ilustra cómo los receptores de la inmunidad innata pueden mediar tanto las respuestas beneficiosas como dañinas, según el tipo de señal inducida por el patógeno.

La asociación entre estos polimorfismos y las infecciones causadas por patógenos que no son gram-negativos ha sido analizada; por ejemplo, el virus respiratorio sincitial mostró estimular la respuesta inmune innata vía TLR4;<sup>41</sup> sin embargo otra investigación posterior no corroboró este resultado.<sup>42</sup>

Aunque estos estudios genéticos y funcionales del TLR4 muestran la existencia de una posible asociación de este receptor y la susceptibilidad a bacterias gram-negativas u otras infecciones, la mayoría de estos resultados no son estadísticamente relevantes debido al pequeño tamaño de la muestra y a que los casos positivos no han sido confirmados en estudios de validación.<sup>6</sup>

El TLR4 también ha sido objeto de análisis en enfermedades no infecciosas como son: la aterosclerosis, enfermedades autoinmunes, asma y cáncer.<sup>43</sup>

Un estudio inicial encontró que el polimorfismo D299G estaba asociado con una disminución del riesgo a la aterosclerosis.<sup>44</sup> Otros reportes han encontrado asociación con la susceptibilidad a las enfermedades cardiovasculares.<sup>12,45,46</sup>

Aunque se ha informado una asociación entre este polimorfismo y la artritis reumatoide, otros estudios han obtenido resultados de no-asociación.<sup>6,47,48</sup>

#### *Polimorfismos en el TLR2 y su asociación con la infección*

Entre los TLR, el TLR2 es el que reconoce un número mayor de patógenos donde se incluyen bacterias, virus hongos y parásitos. Las células de personas con el polimorfismo Arg733Gln en este receptor, son menos susceptibles a los péptidos bacterianos derivados de los patógenos reconocidos por este TLR<sup>32</sup> y este polimorfismo también predispone a infecciones producidas por *Staphylococcus*<sup>32</sup> o *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>49</sup> Otro polimorfismo, el Arg677Trp, afecta la región intracelular que produce la activación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) por el *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium tuberculosis*<sup>50</sup> incrementando, en humanos, la susceptibilidad a la lepra<sup>51,52</sup> y a la tuberculosis.<sup>53</sup>

El SNP sinónimo C597T ha sido recientemente asociado con la meningitis tuberculosa y con un estado de reactividad en la lepra, índice de un mal pronóstico de la enfermedad.<sup>54,55</sup>

El polimorfismo Arg753Gln ha sido asociado con un incremento del riesgo a la reestenosis después de

una angioplastia percutánea transcoronaria,<sup>6</sup> y al riesgo de fiebre reumática en Turquía.<sup>56</sup>

Un estudio realizado en Corea<sup>57</sup> analizó un polimorfismo de repetición de dinucleótidos en el intrón II del TLR2 en pacientes con artritis reumatoide y demostró que aquellos pacientes cuyo genotipo contenía repeticiones cortas GT en el intrón II eran más susceptibles a la artritis reumatoide. Se ha reportado un riesgo mayor de cáncer colorrectal en pacientes croatas portadores de este mismo polimorfismo y del polimorfismo Asp299Gly en el TLR4.<sup>58</sup>

#### *Polimorfismos en el TLR 1, 6 y 10*

El TLR2 forma heterodímeros con los TLR1 y TLR6<sup>59</sup> para mediar la respuesta del hospedero a lipopéptidos en numerosas clases de patógenos. Hawn y cols. reportaron un SNP (T1805G) en el TLR1 capaz de regular la señal NF- $\kappa$ B inducida por los lipopéptidos en células HEK-293 transfectadas.<sup>60</sup>

El TLR6 media el reconocimiento de lipopéptidos como heterodímeros con TLR2 y aunque no se han reportado estudios del papel del TLR6 en la respuesta a infecciones, sí se ha analizado su asociación con otras enfermedades, como lo refleja un trabajo realizado en una población de pacientes suecos con cáncer de próstata, en donde se evaluaron nueve polimorfismos SNP en el TLR6, once en el TLR1 y doce en el TLR10.<sup>61</sup> Como resultado de esta investigación, se concluyó que el polimorfismo en el promotor del gen que codifica para el TLR6 (A1401G) se asocia con una mayor susceptibilidad al cáncer de próstata en individuos heterocigóticos u homocigóticos para A1401G. Tres polimorfismos en el TLR-1 fueron asociados con un riesgo mayor al cáncer de próstata.

También se ha reportado una asociación protectora entre el polimorfismo C744T en el gen del TLR6 y el asma.<sup>62</sup>

El TLR 10 no tiene ligando conocido, se han reportado tres SNP débilmente asociados con el cáncer de próstata: 720C, 1104C y 2322 G;<sup>61</sup> otro estudio ha vinculado un haplotipo del TLR10 con un riesgo mayor a padecer cáncer nasofaríngeo.<sup>63</sup>

#### *Polimorfismos en el TLR5*

TLR5 es el receptor para la flagelina bacteriana y media el reconocimiento de patógenos como la *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus*, *Bacillus* y *Legionella*.

Un polimorfismo no sinónimo común en el dominio extracelular de unión al cambiar una arginina en

el codón de parada (392STOP) elimina la señal producida por la flagelina en líneas celulares transfectadas y se ha asociado con la susceptibilidad a la enfermedad del legionario.<sup>64</sup>

Este polimorfismo puede hallarse en el 10% de la población, aunque está asociado con una disminución en la producción de citocinas por las células mononucleares de sangre periférica, estimuladas con flagelina, no da lugar a portadores susceptibles a bacterias flageladas.<sup>65</sup> Su alta prevalencia en la población sugiere que debe existir una explicación evolutiva para su existencia.<sup>6</sup>

Se ha asociado este polimorfismo en el codón de parada con la protección a la enfermedad de Crohn<sup>66</sup> y a desarrollar lupus eritematoso (SLE)<sup>67</sup> pero esos hallazgos no han sido corroborados.<sup>6</sup>

### *Polimorfismos en el TLR3*

TLR3 reconoce poli (I:C) (poli-inosina:ácido policitídílico) un análogo sintético del ARN de doble cadena y el ARN de doble cadena viral. Existen pocos resultados respecto a polimorfismos en el TLR3 y su asociación con infecciones u otras enfermedades. Dos artículos han reportado daños (con importancia clínica desconocida) en la transducción de señales provocada por polimorfismos SNP (A722T, C1234T, T908C) en el TLR3 de células transfectadas<sup>68,69</sup> y otro estudio planteó una posible asociación entre los polimorfismos 1378 G y rs3775296 en el TLR3 con secuelas oculares producidas por el síndrome de Stevens-Johnson.<sup>70</sup>

### *Polimorfismos en el TLR9*

El TLR9 reconoce CpG (sitios citosina-fosfato-guanina) que son motivos no metilados presentes en bacterias y virus. Una investigación en pacientes suizos<sup>71</sup> mostró que dos SNP en este receptor, uno en el intrón 1 (G117A) y un SNP sinónimo en la región codificante (G1635A) estaban asociados con una rápida progresión hacia el SIDA en los pacientes infectados con VIH. Los individuos con los genotipos 117GA o 117AA, 1635AG ó 1635GG mostraron un elevado riesgo para la rápida progresión de la enfermedad.

Algunos polimorfismos en la región promotora del gen que codifica para el TLR9 (T-1237C y T-1486C) han sido analizados en la susceptibilidad a la malaria en mujeres de Ghana durante su primer embarazo, observándose que ninguna variante alélica alteró el riesgo a la malaria placentaria; sin embargo, en el caso de madres homocigóticas, o heterocigóticas, es-

tos polimorfismos mostraron diferencias significativas en el peso de los niños al nacer.<sup>72</sup>

Se han reportado asociaciones de determinadas variantes del TLR9 con enfermedades como el asma, lupus eritematoso sistémico y la enfermedad inflamatoria intestinal. El alelo C del T-1237 C fue asociado con un riesgo elevado a padecer asma entre los americanos de origen europeo,<sup>73</sup> mientras en la población japonesa no se encontró una asociación entre ese SNP y el asma.<sup>74</sup>

Se ha planteado una asociación entre el polimorfismo SNP (G1174A) de una variante del intrón 1 y el T-1486C (un SNP en el promotor del gen) con el lupus eritematoso sistémico.<sup>75</sup> El alelo 1174G mostró una prevalencia mayor en pacientes con lupus aunque fue coheredado frecuentemente con el 1486C.<sup>76</sup>

Otros tres estudios en Corea, China y el Reino Unido no han observado asociación entre una o más variantes del TLR9 con el lupus.<sup>77,78</sup>

El gen del TLR9 se localiza en una región cercana al locus de susceptibilidad para la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa, por lo que varios autores han explorado el papel de los polimorfismos genéticos en el TLR9 y la enfermedad inflamatoria intestinal, reportándose una asociación entre el polimorfismo 1237C y la enfermedad de Crohn pero no con la colitis ulcerativa.<sup>79</sup>

## **Receptores similares a los Toll-R (Toll-like) y el trasplante de órganos**

Además del reconocimiento de PAMPs se ha demostrado que los TLR pueden ser activados por ligandos endógenos como las proteínas de choque térmico, el sulfato de heparano, surfactantes y fibrinógeno.<sup>80-84</sup> En eventos de origen no-infeccioso como el proceso de isquemia/reperfusión (I/R) durante el trasplante de órganos, los ligandos endógenos liberados como resultado del daño celular poseen la capacidad de activar los TLR. La activación de las células portadoras de TLR produce la liberación de citocinas proinflamatorias y quimiocinas, reclutándose macrófagos, neutrófilos y células T que como resultado producen una actividad inflamatoria a gran escala.

Algunos datos experimentales han mostrado, en modelos animales, la activación selectiva funcional de los TLR durante el daño I/R en diferentes órganos. En uno de estos modelos el daño I/R del miocardio mostró que los ratones deficientes del TLR4 habían padecido menos infartos y menos inflamación después de la reperfusión miocárdica,<sup>85</sup> mientras que el TLR2 mostró estar involucrado en el remodelaje cardíaco después del infarto del miocardio.

Investigaciones en ratones *knockout* demostraron que el TLR4, y no el TLR2, se requería para iniciar el daño por I/R, lo que se reflejó en la función hepática con una inducción local de citocinas y quimiocinas inflamatorias. La vía de señalización inducida por la activación de TLR4 fue mediada por el factor regulador del interferón 3 y no por el factor de diferenciación mieloide (MyD88).<sup>86</sup>

Como el TLR4 se expresa en hepatocitos y células no-parenquimatosas, Tsung y cols. examinaron la contribución de esos tipos celulares al proceso de I/R en hígado.<sup>87</sup> Se produjeron ratones quiméricos por la transferencia adoptiva de células de médula de donante en animales receptores irradiados, empleando combinaciones de ratones TLR4 cepa silvestre (WT) y TLR4-/- (cepa carente del TLR4). Los ratones TLR4 WT que recibieron la transferencia adoptiva de células de médula ósea TLR4 -/- fueron protegidos del daño por el mecanismo de I/R en el hígado comparado con los ratones WT/WT. Los niveles de alanina amino transferasa en ratones TLR4 -/- con transferencia adoptiva TLR4 WT fueron comparables con los controles WT/WT. Estos resultados sugieren que el TLR4 expresado en las células no-parenquimatosas juega un papel fundamental en la inducción del daño por el proceso de I/R en el hígado.

El TLR2 en el riñón es expresado fundamentalmente por las células tubulares y parece poseer un papel importante en el caso del daño renal por la I/R. Un estudio encontró que el TLR2 juega un papel proinflamatorio *in vivo* después del daño renal por la I/R, y esto se demostró por la producción reducida de citocinas y quimiocinas, así como por una reducida infiltración linfocítica en ratones TLR2 -/- cuando se comparó con ratones TLR2 WT/WT. Usando estos animales quiméricos se demostró que el parénquima renal juega un papel fundamental en la inducción temprana de la inflamación y el daño por la I/R.<sup>88</sup>

#### *Receptores parecidos a los Toll-R y el rechazo del trasplante*

La interacción entre las células dendríticas y las células T es vital en el rechazo del trasplante, por eso muchos estudios se han focalizado en las células dendríticas. La activación de los TLR en las células dendríticas inicia una cascada de señalización a través de la proteína adaptadora que culmina en la translocación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y como resultado produce la maduración de las células dendríticas, lo que se asocia con un incremento en la expresión de las moléculas coestimuladoras y en la secreción de ci-

tocinas proinflamatorias.<sup>89,90</sup> Posteriormente, esas células dendríticas migran al ganglio linfático e inician una respuesta inmune al activar a los linfocitos T vírgenes. Esta migración es mediada por la inhibición de la activación de los TLR, inducida por quimiocinas inflamatorias y la activación de los receptores de las quimiocinas, como por ejemplo el CCR7.<sup>91,92</sup>

La evidencia de que la producción de proteínas de choque térmico se estimula durante el rechazo del trasplante condujo a la idea de que los TLR podrían estar involucrados en la alo-respuesta.<sup>93</sup>

Mediante un modelo de trasplante de piel en ratones Goldstein y cols.<sup>94</sup> se reportó que el rechazo del injerto por incompatibilidad HY no se producía en ratones MyD88 -/- . En ausencia de MyD88, las pieles de ratones machos MyD88 -/- trasplantadas en receptores femeninos MyD88 -/- sobrevivían más de 100 días, mientras que en el caso de las cepas silvestres (MyD88+/+) las pieles eran rechazadas después de 25 días del trasplante.

Experimentos posteriores confirmaron que la tolerancia al injerto en ausencia de MyD88 se debía a una atenuación en la generación de células T anti-donantes específicas y a una inmunidad Th1 dañada.<sup>95</sup> Aquí se evidencia que los TLR son capaces de controlar la inmunidad adaptativa en el rechazo de aquellos injertos incompatibles respecto a los antígenos menores de histocompatibilidad.

El rechazo del trasplante también puede involucrar mecanismos de señalización independientes de MyD88. TRIF es una molécula adaptadora que media la vía de señalización independiente de MyD88 a través de los receptores TLR3 y TLR4.<sup>96,97</sup> Recientemente, esta molécula fue identificada como un factor crucial en las respuestas dependientes del TLR4.<sup>97</sup> La delección simultánea de los genes MyD88 y TRIF resultó en una sobrevivencia prolongada del trasplante de piel.<sup>98</sup>

En el caso de pacientes con trasplante de pulmón los polimorfismos D299G y T399I en el TLR4 muestran un rechazo agudo menor comparado con los controles carentes de dichos polimorfismos.<sup>99</sup>

En una investigación relacionada con el trasplante de riñón donde se estudiaron 238 pacientes durante un período de 95 meses, los polimorfismos anteriores en el TLR4 mostraron bajos niveles de rechazo agudo y menos eventos ateroscleróticos postrasplante.<sup>100</sup>

Se ha observado que pacientes que recibieron riñones de donantes heterocigóticos para ambos polimorfismos mostraron un rechazo agudo reducido, mientras que no se encontró asociación entre estos alelos y el rechazo del trasplante en el caso de los receptores.<sup>101</sup>



## Receptores parecidos a los Toll-R y el trasplante de células madre hematopoyéticas

Los TLR juegan un papel importante en las complicaciones postrasplante, especialmente las relacionadas con episodios infecciosos. El polimorfismo TLR4 T399I ha sido implicado en la patogénesis de la enfermedad del injerto *versus* hospedero (GVHD) en el caso del trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT).<sup>102,103</sup> Determinados polimorfismos en este receptor han sido asociados con la hiporrespuesta a lipopolisacáridos;<sup>103</sup> esto supuestamente conduce a un reducido riesgo de GVHD pero consecuentemente resultaría en un alto riesgo a infecciones provocadas por bacterias gram-negativas; sin embargo, lo anterior no ha sido observado en los pacientes analizados.<sup>104</sup>

Determinados polimorfismos en los genes TLR-1 y TLR6 han sido investigados en pacientes con aspergilosis después del trasplante de células madre hematopoyéticas, y algunos genotipos específicos han sido asociados con un elevado riesgo de infección.<sup>105</sup>

### CONCLUSIONES

Los TLR son fundamentales en la inmunidad innata y determinados polimorfismos en sus genes regulan la función inmune. Esta regulación va desde el control de las cascadas inflamatorias, la elaboración de moléculas efectoras y la eliminación de patógenos hasta las interacciones con la respuesta adaptativa. Aunque la evidencia inicial sugiere que estos polimorfismos influyen en la producción celular de citocinas y quimiocinas, aún no se conoce *in vivo* otra función que sea afectada.

Si analizamos los resultados obtenidos respecto al papel de los polimorfismos SNP específicos en el gen que codifica para los TLR, estos estudios muestran una posible asociación a la susceptibilidad, infecciones y quizás a otras enfermedades no infecciosas, pero los resultados de la mayoría de estas investigaciones no poseen gran valor estadístico debido al pequeño tamaño de muestra y a que los hallazgos positivos no han sido confirmados por estudios de validación.<sup>6</sup> Para el esclarecimiento del verdadero papel del polimorfismo de estos genes en la susceptibilidad a infecciones, son esenciales los estudios que incluyan muestras de mayor tamaño, y una validación de los resultados, así como un análisis del genotipaje que incluya una mayor información del haplotipo.

La importancia de los TLR en el rechazo del trasplante de órganos debe ser más estudiada, pues no se

conocen sus ligandos durante este proceso. El futuro conocimiento de los mismos permitirá una mejor comprensión de todos los factores asociados a la maduración de las células dendríticas como mediadoras fundamentales del rechazo del trasplante.

El análisis de estos polimorfismos en el caso del trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT) permitirá confirmar y esclarecer la existencia de determinadas asociaciones inmunogenéticas y su papel en la enfermedad del injerto *versus* hospedero.

El descubrimiento sistemático de nuevas asociaciones genéticas es importante en la comprensión de la función de estos receptores en enfermedades infecciosas, no-infecciosas y en la tolerancia al trasplante.<sup>106</sup> Aunque la mayoría de los estudios realizados emplean estrategias relativamente laboriosas para genotipar un número pequeño de genes candidatos y polimorfismos, actualmente numerosas tecnologías están disponibles para genotipar miles de polimorfismos SNP, y aunque se han identificado nuevos polimorfismos, la importancia clínica de esos descubrimientos no es clara.<sup>107</sup>

La unificación de los estudios genómicos y clínicos, aunque es una ardua tarea, es de vital importancia para valorar el impacto de ciertos genes en la evolución y rechazo del trasplante.

La estimulación de los receptores Toll parece tener un impacto importante en la enfermedad humana. La habilidad de modular esa respuesta con agonistas, o antagonistas, podría afectar la patogénesis de muchas enfermedades, por ejemplo: la activación de la respuesta inmune podría ser útil en el desarrollo de vacunas, mientras que la atenuación de esas respuestas podría beneficiar a pacientes con enfermedades cardiovasculares o artríticos.<sup>30</sup> La comprensión de cómo los polimorfismos en los genes TLR afectan la progresión de la enfermedad permitirá evaluaciones más precisas del riesgo a esas enfermedades y las terapias podrán ser individualizadas según la categoría de riesgo.

### REFERENCIAS

1. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007; 449: 819-26.
2. Akira S. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem*. 2003; 278: 38105-8.
3. Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to *Mycobacteria*: the human model. *Annu Rev Immunol*. 2002; 20: 581-620.
4. Cooke GS, Hill AV. Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nat Rev Genet*. 2001; 2: 967-77.

5. Hill AV. The genomics and genetics of human infectious disease susceptibility *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2001; 2: 373-400.
6. Misch EA, Hawn TR. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease. *Clin Sci.* 2008; 114: 347-60.
7. Molvig J, Baek L, Christensen P, Manogue KR, Vlassara H, Platz P, et al. Endotoxin-stimulated human monocyte secretion of interleukin 1, tumour necrosis factor alpha, and prostaglandin E2 shows stable interindividual differences. *Scand J Immunol.* 1988; 27: 705-16.
8. Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Elouali AH, Verweij CL, Boomsma DI, et al. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet.* 1997; 349: 170-3.
9. Wurfel MM, Park WY, Radella F, Ruzinski J, Sandstrom A, Strout J, et al. Identification of high and low responders to lipopolysaccharide in normal subjects: an unbiased approach to identify modulators of innate immunity. *J Immunol.* 2005; 175: 2570-8.
10. Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC. Comparison of cytokine production in cultures of whole human blood and purified mononuclear cells. *Cytokine.* 1999; 11: 600-5.
11. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20: 197-216.
12. Ameziane N, Beillat T, Verpillat P, Chollet-Martin S, Aumont MC, Seknadji P, et al. Association of the Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with acute coronary events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 61-4.
13. Hill AV. Aspects of genetic susceptibility to human infectious diseases. *Annu Rev Genet.* 2006; 40: 469-86.
14. Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med.* 2002.13; 162: 1028-32.
15. Smirnova I, Mann N, Dols A, Derkx HH, Hibberd ML, Levin M, et al. Assay of locus-specific genetic load implicates rare Toll-like receptor 4 mutations in meningococcal susceptibility. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 6075-80.
16. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 1997; 388(6640): 394-7.
17. Tesar BM, Goldstein DR. Toll-like receptors and their role in transplantation. *Front Biosci.* 2007; 12: 4221-38.
18. Akira S. TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006; 311: 1-16.
19. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ* 2006; 13: 816-25.
20. Albiger B, Dahlberg S, Henriques-Normark B, Normark. Role of the innate immune system in host defense against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *J Intern Med.* 2007; 261: 511-28.
21. Adachi K, Tsutsui H, Kashiwamura S, Seki E, Nakano H, Takeuchi O, et al. Plasmodium berghei infection in mice induces liver injury by an IL-12- and toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88-dependent mechanism. *J Immunol.* 2001; 167: 5928-34.
22. Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med.* 2006; 84: 712-25.
23. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006; 124: 783-801.
24. Beutler B, Eidenschen C, Crozat K, Imler JL, Takeuchi O, Hoffmann JA, et al. Genetic analysis of resistance to viral infection. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7: 753-66.
25. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, et al. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature.* 2002; 420: 324-9.
26. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science.* 2003; 301: 640-3.
27. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, et al. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol.* 2003; 4: 1144-50.
28. Orange JS, Geha RS. Finding NEMO: genetic disorders of NF-[kappa]B activation. *J Clin Invest.* 2003; 112: 983-5.
29. Puel A, Picard C, Ku CL, Smahi A, Casanova JL. Inherited disorders of NF-kappaB-mediated immunity in man. *Curr Opin Immunol.* 2004; 16: 34-41.
30. Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol* 2004; 5: 975-799.
31. Schröder NW, Schumann RR. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect Dis.* 2005; 5: 156-64.
32. Schwartz DA, Cook DN. Polymorphisms of the Toll-like receptors and human disease. *Clin Infect Dis.* 2005; 41(Suppl 7): S403-7.
33. Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE, et al. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis.* 2002; 186: 1522-5.
34. Barber RC, Chang LY, Arnoldo BD, Purdue GF, Hunt JL, Horton JW, et al. Innate immunity SNPs are associated with risk for severe sepsis after burn injury. *Clin Med Res.* 2006; 4: 250-5.
35. Child NJ, Yang IA, Pulletz MC, de Courcy-Golder K, Andrews AL, Pappachan VJ, et al. Polymorphisms in Toll-like receptor 4 and the systemic inflammatory response syndrome. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31(Pt 3): 652-3.
36. Peterowski C, Emmanuilidis K, Miethke T, Gerauer K, Rump M, Ulm K, et al. Effects of functional Toll-like receptor-4 mutations on the immune response to human and experimental sepsis. *Immunology.* 2003; 109: 426-31.
37. Allen A, Obaro S, Bojang K, Awomoyi AA, Greenwood BM, Whittle H, et al. Variation in Toll-like receptor 4 and susceptibility to group A meningococcal meningitis in Gambian children. *Pediatr Infect Dis J.* 2003; 22: 1018-19.
38. Read RC, Pullin J, Gregory S, Borrow R, Kaczmarski EB, di Giovine FS, et al. A functional polymorphism of toll-like receptor 4 is not associated with likelihood or severity of meningococcal disease. *J Infect Dis.* 2001; 184: 640-2.
39. Faber J, Meyer CU, Gemmer C, Russo A, Finn A, Murdoch C, et al. Human toll-like receptor 4 mutations are associated with susceptibility to invasive meningococcal disease in infancy. *Pediatr Infect Dis J.* 2006; 25: 80-1.
40. Hawn TR, Verbon A, Janer M, Zhao LP, Beutler B, Adrem A. Toll-like receptor 4 polymorphisms are associated with resistance to Legionnaires' disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102: 2487-9.
41. Kurt-Jones EA, Chan M, Zhou S, Wang J, Reed G, Bronson R, et al. Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 1315-20.
42. Paulus SC, Hirschfeld AF, Victor RE, Brunstein J, Thomas E, Turvey SE. Common human Toll-like receptor 4 polymorphisms-role in susceptibility to respiratory syncytial virus infection and functional immunological relevance. *Clin Immunol.* 2007; 123: 252-7.

43. Kiechl S, Egger G, Mayr M, Wiedermann CJ, Bonora E, Oberhollenzer F, et al. Chronic infections and the risk of carotid atherosclerosis: prospective results from a large population study. *Circulation*. 2001; 103: 1064-70.
44. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med*. 2002; 347: 185-92.
45. Boekholdt SM, Agema WR, Peters RJ, Zwiderman AH, van der Wall EE, Reitsma PH, et al. Variants of toll-like receptor 4 modify the efficacy of statin therapy and the risk of cardiovascular events. *Circulation*. 2003; 107: 2416-21.
46. Edfeldt K, Bennet AM, Eriksson P, Frostegård J, Wiman B, Hamsten A, et al. Association of hypo-responsive toll-like receptor 4 variants with risk of myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2004; 25: 1447-53.
47. Kilding R, Akil M, Till S, Amos R, Winfield J, Iles MM, et al. A biologically important single nucleotide polymorphism within the toll-like receptor-4 gene is not associated with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2003; 21: 340-2.
48. Sánchez E, Orozco G, López-Nevot MA, Jiménez-Alonso J, Martín J. Polymorphisms of toll-like receptor 2 and 4 genes in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens*. 2004; 63: 54-7.
49. Ogus AC, Yoldas B, Ozdemir T, Uguz A, Olcen S, Keser I, et al. The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur Respir J*. 2004; 23: 219-23.
50. Bochud PY, Hawn TR, Aderem A. Cutting edge: a Toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling. *J Immunol*. 2003; 170: 3451-4.
51. Kang TJ, Chae GT, Kang TJ, Chae GT. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2001; 31: 53-8.
52. Kang TJ, Lee SB, Chae GT. A polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with IL-12 production from monocyte in lepromatous leprosy. *Cytokine*. 2002; 20: 56-62.
53. Ben-Ali M, Barbouche MR, Bousnina S, Chabbou A, Dellagi K. Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004; 11: 625-6.
54. Bochud PY, Hawn TR, Siddiqui MR, Saunderson P, Britton S, Abraham I, et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. *J Infect Dis*. 2008; 197: 253-61.
55. Thuong NT, Hawn TR, Thwaites GE, Chau TT, Lan NT, Quy HT, et al. A polymorphism in human TLR2 is associated with increased susceptibility to tuberculous meningitis. *Genes Immun*. 2007; 8: 422-8.
56. Berdeli A, Celik HA, Ozyürek R, Dogrusoz B, Aydin HH. TLR1 gene Arg753Gln polymorphism is strongly associated with acute rheumatic fever in children. *J Mol Med*. 2005; 83: 535-41.
57. Lee EY, Yim JJ, Lee HS, Lee YJ, Lee EB, Song YW. Dinucleotide repeat polymorphism in intron II of human Toll-like receptor 2 gene and susceptibility to rheumatoid arthritis. *Int J Immunogenet*. 2006; 33: 211-15.
58. Boraska Jelavić T, Barisić M, Drmic Hofman I, Boraska V, Vrdoljak E, Peruzović M, et al. Microsatellite GT polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with colorectal cancer. *Clin Genet*. 2006; 70: 156-160.
59. Omueti KO, Beyer JM, Johnson CM, Lyle EA, Tapping RI. Domain exchange between human toll-like receptors 1 and 6 reveals a region required for lipopeptide discrimination. *J Biol Chem*. 2005; 280: 36616-25.
60. Hawn TR, Misch EA, Dunstan SJ, Thwaites GE, Lan NT, Quy HT, et al. A common human TLR1 polymorphism regulates the innate immune response to lipopeptides. *Eur J Immunol*. 2007; 37: 2059-62.
61. Sun J, Wiklund F, Hsu FC, Bälter K, Zheng SL, Johansson JE, et al. Interactions of sequence variants in interleukin-1 receptor-associated kinase4 and the toll-like receptor 6-1-10 gene cluster increase prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006; 15: 480-5.
62. Tantisira K, Klimecki WT, Lazarus R, Palmer LJ, Raby BA, Kwiatkowski DJ, et al. Toll-like receptor 6 gene (TLR6): single-nucleotide polymorphism frequencies and preliminary association with the diagnosis of asthma. *Genes Immun*. 2004; 5: 343-6.
63. Zhou XX, Jia WH, Shen GP, Qin HD, Yu XJ, Chen LZ, et al. Sequence variants in toll-like receptor 10 are associated with nasopharyngeal carcinoma risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006; 15: 862-6.
64. Hawn TR, Verbon A, Lettinga KD, Zhao LP, Li SS, Laws RJ, et al. A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to Legionnaires Disease. *J Exp Med*. 2003; 198: 1563-72.
65. Dunstan SJ, Hawn TR, Hue NT, Parry CP, Ho VA, Vinh H, et al. Host susceptibility and clinical outcomes in toll-like receptor 5-deficient patients with typhoid fever in Vietnam. *J Infect Dis*. 2005; 191: 1068-71.
66. Gewirtz AT, Vijay-Kumar M, Brant SR, Duerr RH, Nicolae DL, Cho JH. Dominant-negative TLR5 polymorphism reduces adaptive immune response to flagellin and negatively associates with Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006; 290: G1157-63.
67. Demirci FY, Manzi S, Ramsey-Goldman R, Kenney M, Shaw PS, Dunlop-Thomas CM, et al. Association study of Toll-like receptor 5 (TLR5) and Toll-like receptor 9 (TLR9) polymorphisms in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2007; 34: 1708-11.
68. Hidaka F, Matsuo S, Muta T, Takeshige K, Mizukami T, Nunoi H. A missense mutation of the Toll-like receptor 3 gene in a patient with influenza-associated encephalopathy. *Clin Immunol*. 2006; 119: 188-94.
69. Ranjith-Kumar CT, Miller W, Sun J, Xiong J, Santos J, Yarbrough I, et al. Effects of single nucleotide polymorphisms on Toll-like receptor 3 activity and expression in cultured cells. *J Biol Chem*. 2007; 282: 17696-705.
70. Ueta M, Hamuro J, Kiyono H, Kinoshita S. Triggering of TLR3 by polyI: C in human corneal epithelial cells to induce inflammatory cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 331: 285-94.
71. Bochud PY, Hersberger M, Taffé P, Bochud M, Stein CM, Rodrigues SD, et al. Polymorphisms in Toll-like receptor 9 influence the clinical course of HIV-1 infection. *AIDS*. 2007; 21: 441-6.
72. Mockenhaupt FP, Hamann L, von Gaertner C, Bedu-Addo G, von Kleinsorgen C, Schumann RR, et al. Common polymorphisms of toll-like receptors 4 and 9 are associated with the clinical manifestation of malaria during pregnancy. *J Infect Dis*. 2006; 194: 184-8.
73. Lazarus R, Klimecki WT, Raby BA, Vercelli D, Palmer LJ, Kwiatkowski DJ, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies. *Genomics*. 2003; 81: 85-91.



74. Noguchi E, Nishimura F, Fukai H, Kim J, Ichikawa K, Shibasaki M, et al. An association study of asthma and total serum immunoglobulin E levels for Toll-like receptor polymorphisms in a Japanese population. *Clin Exp Allerg.* 2004; 34: 177-83.
75. Tao K, Fujii M, Tsukumo S, Maekawa Y, Kishihara K, Kimoto Y, et al. Genetic variations of Toll-like receptor 9 predispose to systemic lupus erythematosus in Japanese population. *Ann Rheum Dis.* 2007; 66: 905-9.
76. De Jager PL, Richardson A, Vyse TJ, Rioux JD. Genetic variation in toll-like receptor 9 and susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2006; 54: 1279-82.
77. Hur JW, Shin HD, Park BL, Kim LH, Kim SY, Bae SC. Association study of Toll-like receptor 9 gene polymorphism in Korean patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens.* 2005; 65: 266-70.
78. Ng MW, Lau CS, Chan TM, Wong WH, Lau YL. Polymorphisms of the toll-like receptor 9 (TLR9) gene with systemic lupus erythematosus in Chinese. *Rheumatology.* 2005; 44: 1456-7.
79. Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K, et al. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet.* 1996; 14: 199-202.
80. Ohashi K, Burkart V, Flohé S, Kolb H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol.* 2000; 164: 558-61.
81. Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Isseles RD, Wagner H. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem.* 2002; 277: 15107-12.
82. Johnson GB, Brunn GJ, Kodaira Y, Platt JL. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J Immunol.* 2002; 168: 5233-9.
83. Guillot L, Balloy V, McCormack FX, Golenbock DT, Chignard M, Si-Tahar M. Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. *J Immunol.* 2002; 168: 5989-92.
84. Oyama J, Blais C Jr, Liu X, Pu M, Kobzik L, Kelly RA, et al. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation.* 2004; 109: 784-9.
85. Shishido T, Nozaki N, Yamaguchi S, Shibata Y, Nitobe J, Miyamoto T, et al. Toll-like receptor-2 modulates ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation.* 2003; 108: 2905-10.
86. Zhai Y, Shen XD, O'Connell R, Gao F, Lassman C, Busuttill RW, et al. Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway. *J Immunol.* 2004; 173: 7115-9.
87. Tsung A, Hoffman RA, Izuishi K, Critchlow ND, Nakao A, Chan MH, et al. Hepatic ischemia/reperfusion injury involves functional TLR4 signaling in nonparenchymal cells. *J Immunol.* 2005; 175: 7661-8.
88. Leemans JC, Stokman G, Claessen N, Rouschop KM, Teske GJ, Kirschning CJ, et al. Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. *J Clin Invest.* 2005; 115: 2894-903.
89. Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2001; 2: 947-50.
90. Luster AD. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol.* 2002; 14: 129-135.
91. Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Schaniel C, Lenig D, Mackay CR, et al. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol.* 1998; 28: 2760-9.
92. Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait-Yahia S, et al. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med.* 1998; 188: 373-86.
93. Pockley AG. Heat shock proteins, anti-heat shock protein reactivity and allograft rejection. *Transplantation.* 2001; 71: 1503-7.
94. Goldstein DR, Tesar BM, Akira S, Lakkis FG. Critical role of the Toll-like receptor signal adaptor protein MyD88 in acute allograft rejection. *J Clin Invest.* 2003; 111: 1571-8.
95. Lin T, Zhou W, Sacks SH. The role of complement and Toll-like receptors in organ transplantation. *Transpl Int.* 2007; 20: 481-9.
96. Hoebe K, Du X, Georgel P, Janssen E, Tabeta K, Kim SO, et al. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature.* 2003; 424: 743-8.
97. Weighardt H, Jusek G, Mages J, Lang R, Hoebe K, Beutler B, et al. Identification of a TLR4- and TRIF-dependent activation program of dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2004; 34: 558-64.
98. McKay D, Shigeoka A, Rubinstein M, Surh C, Sprent J. Simultaneous deletion of MyD88 and TRIF delays major histocompatibility and minor antigen mismatch allograft rejection. *Eur J Immunol.* 2006; 36: 1994-2002.
99. Palmer SM, Burch LH, Davis RD, Herczyk WF, Howell DN, Reinsmoen NL, et al. The role of innate immunity in acute allograft rejection after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 168: 628-32.
100. Ducloux D, Deschamps M, Yannaraki M, Ferrand C, Bamouid J, Saas P, et al. Relevance of Toll-like receptor-4 polymorphisms in renal transplantation. *Kidney Int.* 2005; 67: 2454-61.
101. Palmer SM, Burch LH, Mir S, Smith SR, Kuo PC, Herczyk WF, et al. Donor polymorphisms in Toll-like receptor-4 influence the development of rejection after renal transplantation. *Clin Transplant.* 2006; 20: 30-6.
102. Elmaagacli AH, Koldehoff M, Hindahl H, Steckel NK, Trensche R, Peceny R, et al. Mutations in innate immune system NOD2/CARD 15 and TLR4 (Thr399Ile) genes influence the risk for severe acute graft-versus-host disease in patients who underwent an allogeneic transplantation. *Transplantation.* 2006; 81: 247-54.
103. Lorenz E, Schwartz DA, Martin PJ, Gooley T, Lin MT, Chien JW, et al. Association of TLR4 mutations and the risk for acute GVHD after HLA-matched-sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2001; 7: 384-7.
104. Norata GD, Garlaschelli K, Ongari M, Raselli S, Grigore L, Benvenuto F, et al. Effect of the Toll-like receptor 4 (TLR4) variants on intima-media thickness and monocyte-derived macrophage response to LPS. *J Intern Med.* 2005; 258: 21-7.
105. Kesh S, Mensah NY, Peterlongo P, Jaffe D, Hsu K, Van Den Brink M, et al. TLR1 and TLR6 polymorphisms are associated with susceptibility to invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1062: 95-103.
106. Mullighan CG, Bardy PG. New directions in the genomics of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007; 13: 127-44.
107. Conrad DF, Andrews TD, Carter NP, Hurles ME, Pritchard JK. A high-resolution survey of deletion polymorphism in the human genome. *Nat Genet.* 2006; 38: 75-81.