

## Tema de reflexión

**Aplicaciones terapéuticas de los agonistas de TLRs**Frank Hanz Robledo Ávila,<sup>1</sup> Marco A Velasco Velázquez<sup>2</sup><sup>1</sup> Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.<sup>2</sup> Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UNAM.**Introducción**

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa del organismo contra microorganismos patógenos. La interacción entre las células del sistema inmune innato y los patógenos involucra un limitado repertorio de receptores codificados en línea germinal llamados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs por sus siglas en inglés). Dentro del grupo de los PRRs se incluyen a los receptores tipo Toll (TLRs), receptores tipo lectina C (CLRs), receptores tipo NOD (NLRs) y receptores tipo RIG (RLRs). Todos estos receptores reconocen secuencias específicas presentes en moléculas microbianas, que se conocen como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés).<sup>1</sup> Al ser ligandos de los PRRs, dichas secuencias juegan un papel importante en la activación de la respuesta inmune innata producida por microorganismos.

La adecuada activación de la respuesta inmune innata es necesaria para generar una buena respuesta inmune adaptativa, esto ha llevado a proponer el uso de ligandos de PRRs para el tratamiento de diversas patologías. El presente texto revisa las actuales aplicaciones clínicas de algunos agonistas de los receptores tipo Toll y explora sus posibles aplicaciones futuras a la luz de los resultados obtenidos en diversos modelos experimentales.

**Características de los TLRs y sus ligandos**

Los TLRs constituyen una familia de glicoproteínas integrales de membrana que funcionan como sensores primarios del sistema inmune innato al reconocer PAMPs. Estructuralmente, los TLRs se caracterizan por contener un dominio extracelular que contiene motivos ricos en repeticiones de leucina (LRR), una estructura de una sola  $\alpha$ -hélice transmembranal y un dominio de señalización citoplasmático homólogo al del receptor de interleucina 1 (IL-1R), llamado TIR.<sup>1,2</sup> En humanos, la familia de los TLRs abarca 10 miembros (TLR1-TLR10) que se expresan en varios tipos celulares del sistema inmune, principalmente en células dendríticas, macrófagos, células B, y células T, aunque también pue-

den expresarse en células que no pertenecen al sistema inmune (cuadro 1).

Estos receptores son capaces de reconocer ligandos de diversa naturaleza (incluyendo lípidos, ácidos nucleicos y proteínas) presentes en microorganismos. Los ligandos naturales conocidos para los diferentes TLRs se anotan en el cuadro 1.<sup>1,4,5</sup> Tras el reconocimiento de su ligando, el TLR promueve la activación de una cascada de señalización que sigue principalmente dos vías: a) la dependiente de la proteína MyD88, que finaliza con la activación del factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), y b) la dependiente de la proteína TRIF, que finaliza con la activación del factor regulador de interferón (IRF). En consecuencia, se inicia la producción de citocinas proinflamatorias y/o interferones tipo I necesaria para la activación de otros componentes del sistema inmune innato y la inducción de la inmunidad adaptativa.<sup>6</sup>

**Agonistas de TLRs****Imidazoquinolinas**

Se sabe que las imidazoquinolinas pueden inducir la producción de citocinas proinflamatorias y citocinas reguladoras. Por esto, las imidazoquinolinas se han clasificado como moléculas modificadoras de la respuesta inmune (IRMs) de bajo peso molecular. El imiquimod (R-837, S-26308), un miembro de esta familia, fue aceptado por la FDA en 1997 para el tratamiento de verrugas genitales externas (condilomas acuminados) causadas por el virus del papiloma humano, convirtiéndose en el primer IRM de aplicación tópica que salió al mercado.

El imiquimod es un agonista de TLR-7 y promueve la expresión de numerosas citocinas, incluyendo IFN- $\alpha$ , IL-1, -6, -8, -10, -12, y TNF- $\alpha$ . En consecuencia, este fármaco estimula la actividad de células NK, la proliferación de células B y la activación de células de Langerhans, que son las principales células centinela en la piel.<sup>7</sup> Adicionalmente, el imiquimod estimula a las células Th1 para secretar IFN- $\gamma$ , el cual a su vez promueve la activación de linfocitos T citotóxicos. En conjunto, estos efectos indu-

cen el establecimiento de la inmunidad a largo plazo, especialmente contra virus.<sup>8</sup> Por esta razón, el imiquimod es efectivo para el tratamiento de verrugas genitales causadas por el virus del papiloma humano. En particular, es una buena opción para el tratamiento de verrugas en pacientes inmunocomprometidos, VIH positivos o que han recibido algún trasplante.<sup>9</sup>

En el 2004, la FDA aprobó una nueva indicación para el imiquimod: el tratamiento del carcinoma de células basales superficial (sBCC). La efectividad del tratamiento con imiquimod en sBCC se ha demostrado en diversos estudios de doble ciego donde el 73-87% de los pacientes presentaron respuestas completas en esquemas de dosificación con efectos adversos aceptables.<sup>10,11</sup>

Aunque el mecanismo del efecto antitumoral del imiquimod involucra la inducción de la síntesis de citocinas, este fármaco presenta por sí mismo actividad antitumoral, pues induce apoptosis en células de carcinoma de células basales<sup>12</sup> y en células de melanoma.<sup>13</sup> Este efecto es independiente de receptores membranales de muerte y desaparece cuando las células tumorales producen grandes cantidades de Bcl-2 o se inhibe la activación de caspasas.<sup>13</sup>

Otro posible mecanismo por el cual el imiquimod tiene efecto antitumoral es la inhibición de la angiogénesis. En un modelo murino de hemangioma, la aplicación tópica de imiquimod inhibe el crecimiento vascular tumoral; esta inhibición se asoció con un incremento en la expresión del inhibidor tisular de la metaloproteasa de matriz 1 (MMP-1)

**Cuadro 1.** Algunos ligandos naturales descritos, su origen y el TLR que lo reconoce.

Ligando	Origen ligando	TLR activado
<b>Bacterias</b>		
LPS	Bacterias Gram -	TLR4
Diácil lipopéptido	<i>Mycoplasma</i>	TLR2/TLR6
Triácil lipopéptido	Micobacterias	TLR2/TLR1
LTA	<i>Streptococcus</i> grupo B	TLR2/TLR6
Peptidoglicano	Bacterias Gram +	TLR2
Porinas	<i>Neisseria</i>	TLR2
Lipoarabinomanano	Micobacterias	TLR2
Flagelina	Bacterias flageladas	TLR5
CpG-DNA	Bacterias y micobacterias	TLR9
HSP 60	Bacterias	TLR4
<b>Hongos</b>		
Zymosan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TLR2/TLR6
Fosfolipomanano	<i>Candida albicans</i>	TLR2
Manano	<i>Candida albicans</i>	TLR2
Glucoronoxilomanano	<i>Cryptococcus neoformans</i>	TLR2/TLR4
<b>Parásitos</b>		
t-GPI-mutina	<i>Trypanosoma</i>	TLR2
Glicoinositol fosfolípido	<i>Trypanosoma cruzi</i>	TLR4
Hemozoina	<i>Plasmodium</i>	TLR9
Glicoinositol fosfolípido	<i>Leishmania major</i> , <i>Leishmania donovani</i>	TLR2
Glicoinositol fosfolípido con estructura alquilacilglicerol no saturado	<i>Trypanosoma cruzi</i>	TLR2
CpG	<i>Trypanosoma brucei</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i>	TLR9
<b>Virus</b>		
DNA	Virus	TLR9
dsRNA	Virus	TLR3
ssRNA (+)	Virus Coxsackie B, Parechovirus, virus Sendai	TLR7, TLR8
ssRNA (+)	Virus del dengue, HIV	TLR7
ssRNA (-)	Virus de la influenza	TLR7
Proteínas de envoltura	RSV, MMTV	TLR4
Hemaglutinina	Virus del sarampión	TLR2
No determinada	HCMV, HSV1	TLR2
<b>Huésped</b>		
Proteínas de choque térmico 60, 70		TLR4
Fibrinógeno		TLR4
Hialuronano		TLR4
Proteína surfactante A		TLR4
Células necróticas		TLR2
Complejos IgG-cromatina		TLR9

y la disminución en la actividad de la metaloproteasa de matriz 9 (MMP-9).<sup>14</sup> De manera similar, en tumores generados a ratones por la inyección de queratinocitos humanos transformados o de células murinas de sarcoma de pulmón L1, la administración tópica de imiquimod al 5% durante 3 días consecutivos inhibió la angiogénesis. En esos animales se observó que el imiquimod indujo la síntesis de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-18.<sup>15</sup>

### Adyuvantes de vacunas

Las vacunas regularmente son creadas con microorganismos atenuados o muertos originando una pérdida de antigenicidad. Los agonistas de TLRs pueden funcionar como buenos adyuvantes naturales debido a su capacidad de inducir una respuesta Th1 activando la vía NF- $\kappa$ B, originando la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-12, además de inducir la síntesis de interferones tipo I.<sup>6</sup>

Un ejemplo claro y muy utilizado en vacunas experimentales en modelos animales es el adyuvante completo de Freund, el cual incluye *Mycobacterium tuberculosis* muerta por calor que pueden activar TLR2 y TLR4 y generar una buena respuesta proinflamatoria. De manera similar, la vacuna BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) contiene moléculas derivadas de micobacterias que activan TLR2 y TLR4. Aunque la vacuna BCG fue originalmente desarrollada contra la tuberculosis, se han encontrado efectos benéficos al administrarla en tumores de vejiga.<sup>16</sup>

Otro ejemplo de ligandos de TLRs empleados en vacunas comerciales lo constituye la vacuna Fendrix<sup>®</sup> contra el virus de la hepatitis B (HBV). Esta vacuna, empleada en pacientes que están en hemodiálisis o que van a recibirla, contiene monofosforil lípido-A (MPL) que es reconocido por TLR4. En comparación con otras vacunas contra HBV, Fendrix<sup>®</sup> induce anticuerpos que aparecen más rápidamente, tienen títulos más altos y son más persistentes.<sup>17</sup> El MPL también es efectivo como adyuvante en vacunas contra virus del papiloma y herpes genital.<sup>6</sup>

Otros agonistas muy estudiados últimamente son los CpG ODN (oligodesoxinucleótidos); éstos estimulan TLR9 favoreciendo la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- $\alpha$ , interferones tipo I y citocinas reguladoras producidas por las células B como la IL-10.<sup>18</sup> Varios estudios en ratón han demostrado que la respuesta inmune innata activada por CpG ODN administrados por inyección, inhalado u oral puede proteger contra un amplio rango de enfermedades virales, bacterianas y contra algunos parásitos patógenos, incluyendo retos letales con agentes infecciosos.<sup>18</sup> En humanos, los CpG ODN se han usado como adyuvantes en la vacuna contra la hepatitis B. En un estudio doble ciego de fase I/II, se encontraron títulos mayores de anticuerpos específicos contra el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) en

el grupo de individuos que recibieron la vacuna mezclada con el ODN CPG 7909 (clase B).<sup>19</sup>

Adicionalmente, la activación de TLR9 rápidamente suprime la replicación del virus de la hepatitis B (HBV) en ratones transgénicos; este hallazgo sugiere que los CpG ODN podrían ser útiles en el tratamiento de infecciones virales crónicas en humanos. El efecto antiviral de los CpG ODN se debe a la inducción de la secreción de IFN- $\alpha$ , pues los hepatocitos no expresan TLR9.<sup>18</sup> De manera similar, se ha encontrado efecto protector de los CpG ODN en ratones y macacos retados con *Leishmania*.<sup>20</sup>

### Agonistas de TLR-4 en la terapia antitumoral

Recientemente se ha demostrado que diversos tumores y muchas líneas tumorales sobreexpresan TLRs. Aunque no se conoce la importancia de este fenómeno, se ha sugerido que los TLRs participan en la transformación, en la progresión, en el escape inmune y en la resistencia a la quimioterapia. Por estas razones, los TLRs son blancos potenciales de nuevos agentes antitumorales. A continuación se dan algunos ejemplos del uso experimental de agonistas de TLR4 para el tratamiento de tumores.

El ONO-4007 (Ono Pharmaceutical Co, Osaka Japón) es un compuesto no tóxico derivado del lípido A del LPS, reconocido por TLR4, que induce la producción de TNF- $\alpha$ . En tumores que son sensibles a la acción del TNF- $\alpha$ , se ha demostrado que este compuesto tiene una alta eficacia.<sup>21</sup> El DT-5461 (Daiichi Pharmaceutical Co, Tokio Japón) es un análogo sintético de baja toxicidad del lípido A, reconocido por TLR4. En ratones, el DT-5461 inhibe las metástasis pulmonares y hepáticas de líneas celulares tumorales de linfoma y de melanoma que son altamente metastáticos.<sup>22</sup> Finalmente, el GLA-60 es un análogo sintético del lípido A reconocido por TLR4. Este compuesto inhibe la formación de metástasis pulmonares en un modelo murino de melanoma B16, probablemente favoreciendo el reclutamiento de células NK.<sup>23</sup>

### Conclusiones y perspectivas

En conjunto, las evidencias presentadas aquí muestran que los agonistas de TLRs pueden ser útiles en el tratamiento o prevención de enfermedades infecciosas y neoplásicas. Sin embargo, existe evidencia creciente de la participación de los TLRs en enfermedades no infecciosas, por lo tanto en el futuro pueden desarrollarse agonistas/antagonistas de estos receptores con aplicaciones en patologías cardiovasculares, gastrointestinales, neurológicas, dermatológicas y, por supuesto, inmunológicas.<sup>24</sup> Como ejemplo podemos mencionar que numerosos estudios preclínicos muestran que la administración de ligandos de TLR9 bloquea la producción de citocinas Th2 y previenen los síntomas del asma.

## Referencias

1. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801.
2. Gay N, Gangloff M, Weber A. Toll-like receptors as molecular switches. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 693-8.
3. Rock F, Hardiman G, Timans J, Kastelein R, Bazan J. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 588-93.
4. Diebold S. Recognition of viral single-stranded RNA by Toll-like receptors. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60: 813-23.
5. Gazzinelli R, Denkers E. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 895-906.
6. Romagne F. Current and future drugs targeting one class of innate immunity receptors: the Toll-like receptors. *Drug Discov Today* 2007; 12: 80-7.
7. Gibson S, Lindh J, Riter T et al. Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. *Cell Immunol* 2002; 218: 74-86.
8. Harrison C, Miller R, Bernstein D. Post-therapy suppression of genital herpes simplex virus (HSV) recurrences and enhancement of HSV-specific T-cell memory by imiquimod in guinea pigs. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 2059-64.
9. Sparling J, Checketts S, Chapman M. Imiquimod for plantar and periungual warts. *Cutis* 2001; 68: 397-9.
10. Geisse J, Caro I, Lindholm J, Golitz L, Stampone P, Owens M. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from two phase III, randomized, vehicle-controlled studies. *J Am Acad Dermatol* 2004; 50: 722-33.
11. Schulze H, Cribier B, Requena L et al. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from a randomized vehicle-controlled phase III study in Europe. *Br J Dermatol* 2005; 152: 939-47.
12. Schön M, Bong A, Drewniok C et al. Tumor-selective induction of apoptosis and the small-molecule immune response modifier imiquimod. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1138-49.
13. Schön M, Wienrich B, Drewniok C et al. Death receptor-independent apoptosis in malignant melanoma induced by the small-molecule immune response modifier imiquimod. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 1266-76.
14. Kerkelä E, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol* 2003; 12: 109-25.
15. Majewski S, Marczak M, Mlynarczyk B, Benninghoff B, Jablonska S. Imiquimod is a strong inhibitor of tumor cell-induced angiogenesis. *Int J Dermatol* 2005; 44: 14-9.
16. Martinez-Piñero J. BCG vaccine in superficial bladder tumors: eight years later. *Eur Urol* 1984; 10: 93-100.
17. Kundi M. New hepatitis B vaccine formulated with an improved adjuvant system. *Expert Rev Vaccines* 2007; 6: 133-40.
18. Krieg A. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 471-84.
19. Cooper C, Davis H, Morris M et al. CPG 7909, an immunostimulatory TLR9 agonist oligodeoxynucleotide, as adjuvant to Engerix-B HBV vaccine in healthy adults: a double-blind phase I/II study. *J Clin Immunol* 2004; 24: 693-701.
20. Verthelyi D, Gursel M, Kenney R et al. CpG oligodeoxynucleotides protect normal and SIV-infected macaques from *Leishmania* infection. *J Immunol* 2003; 170: 4717-23.
21. Garay R, Viens P, Bauer J et al. Cancer relapse under chemotherapy: why TLR2/4 receptor agonists can help. *Eur J Pharmacol* 2007; 563: 1-17.
22. Sato K, Saiki I, Yoo Y et al. DT-5461, a new synthetic lipid A analogue, inhibits lung and liver metastasis of tumor in mice. *Jpn J Cancer Res* 1992; 83: 1081-7.
23. Nakatsuka M, Kumazawa Y, Homma J, Kiso M, Hasegawa A. Inhibition in mice of experimental metastasis of B16 melanoma by the synthetic lipid A-subunit analogue GLA-60. *Int J Immunopharmacol* 1991; 13: 11-9.
24. Ulevitch R. Therapeutics targeting the innate immune system. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 512-20.