

Veterinaria México

Volumen 36
Volume

Número 4
Number

Octubre-Diciembre 2005
October-December

Artículo:

Papel de los receptores tipo toll en la inmunidad innata y su implicación en medicina veterinaria

Derechos reservados, Copyright © 2005:
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

**Otras secciones de
este sitio:**

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

***Others sections in
this web site:***

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)

Papel de los receptores tipo toll en la inmunidad innata y su implicación en medicina veterinaria

Role of toll-like receptors in innate immunity and their implication in veterinary medicine

Carlos Ramón Bautista Garfias* Juan Joel Mosqueda Gualito*

Abstract

The innate immunity concept has undergone a noticeable change during the last five years, due to the discovery of the mammalian Toll-like receptors (TLRs, transmembrane proteins expressed by cells of the innate immune system) and its role in recognizing microbial pathogens. At present, the study of these receptors is of great interest —mainly in human medicine and recently in veterinary medicine— due to the fact that these have a central role in both, triggering innate immunity as well as coordinating innate and adaptive immunity. This review seeks to show the Toll-like receptor's concept in the immunity processes from the perspective of their importance in veterinary medicine.

Key words: TOLL-LIKE RECEPTOR, INNATE IMMUNITY, VETERINARY MEDICINE.

Resumen

El concepto de inmunidad innata ha tenido un cambio notable durante los últimos cinco años, debido al descubrimiento de los receptores tipo Toll (TLR, proteínas transmembranales expresadas por células del sistema inmunitario innato) en los mamíferos y su participación en el reconocimiento de patógenos microbianos. Actualmente el estudio de estos receptores es de gran interés, sobre todo en medicina humana y muy recientemente en medicina veterinaria, debido a que desempeñan un papel central, tanto en el desencadenamiento de la inmunidad innata, como en la coordinación entre las inmunidades innata y adaptativa. Esta revisión pretende mostrar el concepto del papel de los receptores tipo Toll en los procesos de inmunidad desde la perspectiva de su importancia en medicina veterinaria.

Palabras clave: RECEPTOR TIPO TOLL, INMUNIDAD INNATA, MEDICINA VETERINARIA.



Recibido el 14 de octubre de 2004 y aceptado el 7 de abril de 2005.

* Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, km 11.5, Carretera federal Cuernavaca-Cuautla, 62550, Jiutepec, Morelos, México.

Introduction

Evolution has armed mammals with two main forms of defense against infectious agents: innate immunity and adaptive immunity. The first one provides a host defense against invading microbes which is immediate, unspecific and which does not have memory, while the second one is naïve, gradual and must be taught through somatic generation of a diverse receptor repertoire, in order to develop an appropriate immune response against invading agents.¹ This difference in reaction suggest that all innate immunity responses must be based on the recognition of molecular patterns associated to microorganisms. In contrast, the adaptive immune response depends mainly in two types of specialized lymphocytes, T lymphocytes and B lymphocytes, which specific receptors are generated somatically in response to antigen presentation by professional antigen presenting cells (interdigitant dendritic cells, macrophages and B cells).² This process induces an antigen-dependent clonal expansion of lymphocytes T and B, which gives as a result, long lasting humoral and cellular immune responses. However, acquired immunity does not occur immediately in response to a new antigen or pathogen and the delay in the response could have a devastating effect on host survival.³ Therefore, the innate and the acquired immune responses are coordinated in such a way that the innate immune response represents the initial process which directs the defense of the mammal host.³

Microorganisms express molecular patterns which are specific and easily differentiable from those of the host; these include double stranded viral RNA; unmethylated CpG dinucleotides present in bacterial DNA, but scarce in vertebrates; manans from yeast; mycobacterial glycolipids; lipoproteins from bacteria and parasites; lipoteichoic acids from gram-positive bacteria and lipopolysaccharide (LPS) from gram-negative bacteria.³⁻⁵ Chordate hosts have developed pattern recognition receptors to detect these molecules associated to pathogens. Such receptors can be divided in classes: cell surface receptors, secreted receptors, intracellular and signaling receptors;¹ these last ones being capable of inducing cytokine expression which subsequently amplify the innate immune response and direct the adaptive immune response. This mechanism, however, is more complex than one would have thought.^{1,6}

The immune system has developed different methods to discriminate foreign antigens from its own. The strategy of microbial recognition is based on the detection of conserved molecular patterns which are essential byproducts of microbial physiology. Charles

Introducción

La evolución ha dotado a los mamíferos con dos formas principales de defensa contra agentes infecciosos: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. La primera proporciona una defensa del hospedero contra microorganismos invasores que es inmediata, inespecífica y no tiene memoria, mientras que la segunda es virgen, tarda en desarrollarse y se le debe enseñar a través de la generación somática de un repertorio diverso de receptores, con objeto de desarrollar una respuesta inmunitaria apropiada contra los microbios invasores.¹ Esta diferencia de reacción sugiere que las respuestas de inmunidad innata se deben basar en el reconocimiento de patrones moleculares asociados con microorganismos. En contraste, la respuesta inmunitaria adaptativa depende en gran parte de dos clases de linfocitos especializados, los linfocitos T y los linfocitos B, cuyos receptores específicos son generados somáticamente en respuesta a la presentación de antígeno por células profesionales presentadoras de antígeno (células dendríticas principalmente de tipo interdigitante, macrófagos y otras células B).² Este proceso provoca la expansión clonal antígeno-dependiente de linfocitos T y B, que da por resultado una memoria inmunitaria humoral y celular de larga duración. Sin embargo, la inmunidad adquirida no ocurre inmediatamente en respuesta a un antígeno o patógeno nuevo y el retardo en la respuesta podría tener un efecto devastador en la supervivencia del hospedero.³ Por tanto, las respuestas inmunitarias innata y adquirida están coordinadas, de tal forma que la respuesta inmunitaria innata representa el proceso inicial e instructor en la defensa del hospedero mamífero.³

Los microorganismos expresan patrones moleculares que son específicos y rápidamente diferenciables de los del hospedero; éstos incluyen ARN viral de doble cadena; dinucleótidos CpG no metilados comunes en el ADN bacteriano, pero escasos en el ADN de vertebrados; mananos de las levaduras; glicolípidos de las micobacterias; lipoproteínas de bacterias y parásitos; ácidos lipoteicoicos de bacterias grampositivas y LPS de bacterias gramnegativas.³⁻⁵ El hospedero vertebrado ha desarrollado receptores de reconocimiento específicos de patrones para detectar a estas moléculas asociadas con patógenos. Dichos receptores pueden dividirse en clases: receptores secretados, endocíticos y de señalización;¹ estos últimos son capaces de inducir la expresión de una variedad de citoquinas que subsecuentemente amplifican la respuesta inmunitaria innata y dirigen la respuesta inmunitaria adaptativa. Este mecanismo, sin embargo, es más complejo de lo que se pensaba.^{1,6}

Janeway developed the idea that there are microbial structures that form molecular patterns and that such structures would be recognized by those pattern-recognition receptors.⁷

Nowadays, such invariant structures are known as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). These are characterized for being expressed only by microbes (and are not produced by the host); are conserved in similar microorganisms and their expression is essential for the survival of the microbe.^{5,8} Two common PAMPs are LPS from gram-negative bacteria and peptidoglycan (PGN) from gram-negative bacteria. These PAMPs are recognized by receptors from the innate immune system called pattern recognition receptors (PRRs). Because PAMPs are produced only by microorganisms, the innate immune system recognizes them as “molecular signatures” of infection, and their recognition by PRRs prompts the induction of an immune response.⁹

Toll-like Receptors (TLR)

The role of Toll-like receptors (TLR) in the innate immune response was first described in an arthropod, the fruit fly *Drosophila melanogaster*. The Toll protein from *Drosophila* was originally identified as a factor essential for the dorsoventral polarity during embryogenesis.¹⁰ Toll was also recognized as a transmembrane receptor which mediates activation of the transcription factor known as Dorsal (which is homologous to NF- κ B, the transcription factor in vertebrates) by mediating degradation of Cactus, a Dorsal repressor protein. Once freed from Cactus, Dorsal can translocate to the nucleus, where it activates specific genes. Due to the homology of Toll with the interleukin 1 receptor (IL-1R)¹¹ and the conservation of signaling channels in both systems, it was proposed that Toll could be involved in regulating the immune response;¹²⁻¹⁴ which was corroborated with the demonstration of its participation in the induction of resistance to fungal infections.¹⁵ Later on, and through searches in expressed-sequence tag (EST) databases using conserved sequences from the Toll/IL-1R signaling domain, a *Drosophila* Toll homologue was identified in humans.¹⁶ From that point on and using similar strategies, a family of proteins, structurally related with Toll and collectively called Toll-like receptors (TLR) was identified, comprising 11 members: TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10,¹⁶⁻²¹ and a recently identified TLR11.²² Similarly, it is certain that in a near future more TLRs will be discovered.²³ It is worth noticing that the family of TLR in humans is subdivided in five subfamilies that, according to the amino acid sequence, are: TLR3, TLR4, TLR5, TLR2 y TLR9. The TLR2 subfamily is composed of TLR1,

El sistema inmunitario ha desarrollado diferentes métodos para discriminar moléculas propias de moléculas extrañas. La estrategia de reconocimiento microbiano se basa en la detección de patrones moleculares conservados que son productos esenciales de la fisiología microbiana. Charles Janeway desarrolló la idea de que hay estructuras microbianas que forman patrones moleculares y que tales estructuras serían reconocidas por receptores de reconocimiento de esos patrones.⁷

Actualmente dichas estructuras invariantes son conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP). Éstos se caracterizan por ser expresados únicamente por microbios (y no son producidos por el hospedero); son relativamente conservados en microorganismos similares y su expresión es esencial para la sobrevivencia del microorganismo.^{5,8} Dos PMAP comunes son el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias gramnegativas y el peptidoglicano (PGN) de las bacterias grampositivas. Estos PMAP son reconocidos por receptores del sistema inmunitario innato denominados receptores de reconocimiento de patrones (RRP). Debido a que los PMAP son producidos sólo por los microorganismos, el sistema inmunitario innato los reconoce como “firmas moleculares” de la infección, y su reconocimiento por los RRP propicia la inducción de una respuesta inmunitaria.⁹

Receptores tipo Toll (TLR)

La participación de los receptores tipo Toll (TLR) en la respuesta inmunitaria innata se describió por primera vez en un artrópodo, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. La proteína Toll de *Drosophila* originalmente se identificó como un factor requerido para el establecimiento de la polaridad dorso-ventral en el embrión en desarrollo.¹⁰ Toll además se reconoció como un receptor transmembranal que activa el factor de transcripción denominado Dorsal (que es homólogo al factor de transcripción NF- κ B en vertebrados) al mediar la degradación de Cactus, una proteína represora de Dorsal. Una vez liberada de Cactus, Dorsal puede translocarse al núcleo donde activa genes específicos. Debido a la homología de Toll con el receptor de interleucina 1 (IL1)¹¹ y a la conservación de los canales de señalización en ambos sistemas, se propuso que Toll estaba involucrado en la regulación de la respuesta inmunitaria;¹²⁻¹⁴ lo cual se corroboró con la demostración de su participación en la inducción de resistencia a infecciones producidas por hongos.¹⁵ Poco tiempo después, mediante búsquedas en las bases de datos de identificadores de secuencias expresadas (EST), y utilizando secuencias conserva-

TLR2, TLR6 y TLR10; the TLR9 subfamily is composed of TLR7, TLR8 y TLR9.²³

Next, a list of the known TLR and the structures recognized by them (ligands):

TLR1

This receptor distinguishes lipopeptides from bacteria and mycobacteria. Using macrophages from TLR1 deficient mice (TLR1 (-/-)), Takeuchi *et al.* observed that these cells were incapable of producing proinflammatory cytokines when exposed to lipoproteins and triacylated lipopeptides, meanwhile the same cells produced cytokines normally when exposed to diacylated lipopeptides²⁴ as well as *Neisseria meningitidis* soluble factors.²⁵ Moreover, it has been observed that TLR1 is functionally associated with TLR2 to recognize the lipidic configuration of lipoproteins from mycobacteria and has a high homology with TLR6, which could compensate for a deficiency in TLR1.²⁴⁻²⁵ It has been shown that TLR1 recognizes the outer surface protein A (OspA) from the spirochete *Borrelia burgdorferi*, the causative agent of the zoonotic disease of Lyme, which is transmitted to humans and mammals by *Ixodes ticks*.²⁶

TLR2

TLR2 recognizes different bacterial products like lipoproteins from gram-negative bacteria,²⁷ peptidoglycan from gram-positive bacteria,²⁸ lipoteichoic acid from gram-positive bacteria,²⁹ lipoarabinomannan from mycobacteria,³⁰ a phenol-soluble modulín from *Staphylococcus epidermidis*,³¹ glycosylphosphatidylinositol from *Trypanosoma cruzi*,³² glycolipids from *Treponema maltophilum*,³³ porins from *Neisseria*,³⁴ and zymosan from fungi,³⁵ TLR2 also recognizes atypical lipopolysaccharide (LPS) from *Leptospira interrogans*,³⁶ and atypical LPS from *Porphyromonas gingivalis*,³⁷ which suggest that TLR2 has a specific capacity to recognize cylindrical LPS which induces cytokine production.³⁸ Finally, TLR2 recognizes heat shock protein 70 (HSP70) from the host,³⁹ it associates with other TLR, presents differences in expression, transcription tissue concentration and regulation in humans and mice.⁴¹

TLR3

This receptor recognizes double stranded ribonucleic acid (RNA), a molecular pattern associated with viral infections.⁴² It is worth mentioning that double stranded RNA is a potent inducer of Type I interferon, which has antiviral properties, and promotes dendritic cell maturation. TLR3 deficient mice showed a reduced response to double stranded RNA, and a

das en el dominio de señalización de Toll/RIL1, se identificó un homólogo del receptor Toll de *Drosophila* en el humano.¹⁶ A partir de dicho hallazgo, y utilizando estrategias similares, se identificó una familia de proteínas estructuralmente relacionada con la proteína Toll de *Drosophila* que colectivamente se les denomina receptores tipo Toll (TLR) y que consiste de 11 miembros: TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10,¹⁶⁻²¹ y el recién identificado TLR11.²² Asimismo, se ha indicado que seguramente en un futuro próximo se descubrirán más TLR.²³ Cabe señalar que la familia de TLR de humano se subdivide en cinco subfamilias que, de acuerdo con la secuencia de aminoácidos, son: TLR3, TLR4, TLR5, TLR2 y TLR9. La subfamilia TLR2 está compuesta de TLR1, TLR2, TLR6 y TLR10; la subfamilia TLR9 está compuesta de TLR7, TLR8 y TLR9.²³

A continuación se indica, por orden numérico, cada uno de los TLR conocidos y las estructuras que reconocen (ligandos):

TLR1

Este receptor distingue lipopéptidos de bacterias y micobacterias. Utilizando macrófagos de ratones deficientes en TLR1 (TLR1 (-/-)), Takeuchi *et al.* observaron que estas células mostraban incapacidad para producir citoquinas proinflamatorias al exponerse a lipoproteínas y lipopéptidos triacilados, mientras que las mismas células produjeron citoquinas normalmente al exponerse a lipopéptidos diacilados,²⁴ así como factores solubles de *Neisseria meningitidis*.²⁵ Asimismo, se ha observado que TLR1 funcionalmente se asocia con TLR2 para reconocer la configuración lipídica de las lipoproteínas de micobacterias y tiene una homología alta con TLR6, lo que podría compensar una deficiencia en TLR1.²⁴⁻²⁵ Se ha demostrado que TLR1 reconoce la lipoproteína de la superficie externa (OspA) de la espiroqueta *Borrelia burgdorferi*, el agente causal de la enfermedad zoonótica de Lyme, que es transmitida a animales y humanos por garrapatas del género *Ixodes*.²⁶

TLR2

El TLR2 reconoce diferentes productos bacterianos como lipoproteínas de bacterias gramnegativas,²⁷ peptidoglicano de bacterias grampositivas,²⁸ ácido lipoteicoico de bacterias grampositivas,²⁹ lipoarabinomannano de micobacterias,³⁰ una modulina soluble en fenol de *Staphylococcus epidermidis*,³¹ glicoinositolfosfolípidos de *Trypanosoma cruzi*,³² glicolípidos de *Treponema maltophilum*,³³ porinas de *Neisseria*,³⁴ y zymosan de hongos,³⁵ el TLR2 también reconoce lipopolisacárido (LPS) atípico de *Leptospira interrogans*,³⁶ y LPS atípico

reduced production of pro-inflammatory cytokines.⁴² In humans TLR3 is expressed only in myeloid dendritic cells,⁴³ and in mice its expression can be induced in LPS exposed macrophages.⁴² It is believed that these differences are due to inequalities in proximal regulatory sequences in both species.⁴¹

TLR4

TRL4 distinguishes LPS from gram-negative bacteria,⁴⁴ taxol from plants,⁴⁵ a fusion protein from respiratory syncytial virus,⁴⁶ envelope proteins from the mammary tumor virus from mice and the Moloney leukemia virus,⁴⁷ heat shock protein 60 (HSP60) from *Chlamydia pneumoniae*,⁴⁸ HSP60⁴⁹ and HSP70 from host,⁵⁰ extra domain A from fibronectin,⁵¹ oligosaccharide from host hyaluronic acid,⁵² oligosaccharide fragments from host heparan sulfate,⁵³ fibrinogen from host.⁵⁴ Although TRL2 recognizes cylindrical LPS, this stimulates cells only through TRL4.³⁸ The capacity to differentiate variations in molecular composition and the three-dimensional conformation of lipid A from LPS explains the activation of different signaling channels mediated by the TRL.

TLR5

Recognizes flagellin from gram-negative bacteria.⁵⁵ It was observed that, when flagellin -the main protein in flagella from gram-negative bacteria- makes contact with basolateral surfaces in the intestine, it stimulates inflammatory immune responses; when flagellin makes contact with the apical surface there is no response. Investigations using immunolocalization showed that TRL5 is expressed only in the basolateral surface of the intestinal epithelium and when flagellin from *Salmonella* makes contact, it induces a signaling cascade mediated by the pro-inflammatory transcription factor NF- κ B.⁵⁶ Flagellin is a very conserved pathogen associated molecular pattern, and in plants this protein induces an immune response mediated by a transmembranal receptor with a domain rich in leucine, which is characteristic of Toll-like receptors.⁵⁷

TLR6

The human TLR6 has 69% identity with TLR1, and in mice it is expressed in the thymus, spleen, ovaries and lung.¹⁸ While TLR2 recognizes triacetylated lipoprotein from bacteria, TLR6 only recognizes diacetylated lipoproteins like those produced by mycoplasma, which are potent activators of macrophages.⁵⁸ TLR6 acts in a synergic way with TLR2 to recognize peptide-glycans, which are components of gram-positive bacteria.⁵⁹

de *Porphyrromonas gingivalis*,³⁷ que sugiere que TLR2 tiene capacidad específica de reconocimiento de los LPS de forma cilíndrica que inducen la producción de citoquinas.³⁸ Finalmente, TLR2 reconoce la proteína 70 de choque térmico (HSP70) del hospedero,³⁹ se asocia con otros TRL incluyendo TRL1 y TRL6, e inicia la activación de genes característicos de una respuesta de tipo Th2.⁴⁰ Finalmente, el TLR2, al igual que otros TLR, presenta diferencias en humanos y ratones en la expresión, transcripción, concentración tisular y regulación.⁴¹

TLR3

Este receptor reconoce ácido ribonucleico (ARN) de doble cadena, un patrón molecular asociado con posibles infecciones por virus.⁴² Cabe destacar que el ARN de doble cadena es un inductor muy potente de los interferones tipo I, que tienen propiedades antivirales, además de que promueve la maduración de células dendríticas. Ratones deficientes en TLR3 mostraron respuesta disminuida a ARN de doble cadena, además de una producción reducida de citoquinas proinflamatorias.⁴² Mientras que en humanos TLR3 se expresa únicamente en células dendríticas mieloideas,⁴³ en ratones su expresión puede ser inducida en macrófagos expuestos a LPS.⁴² Se cree que estas diferencias se deben a desigualdades en las secuencias de las regiones reguladoras proximales en las dos especies.⁴¹

TLR4

TLR4 distingue LPS de bacterias gramnegativas,⁴⁴ taxol de plantas,⁴⁵ proteína de fusión del virus respiratorio sincitial,⁴⁶ proteínas de la cubierta del virus del tumor mamario de ratón y virus de la leucemia murina de Molones,⁴⁷ proteína 60 de choque térmico (HSP60) derivada de *Chlamydia pneumoniae*,⁴⁸ HSP60⁴⁹ y HSP70 del huésped,⁵⁰ extradominio A de fibronectina,⁵¹ oligosacáridos del ácido hialurónico del hospedero,⁵² fragmentos de polisacárido de sulfato de heparan del hospedero,⁵³ fibrinógeno del hospedero.⁵⁴ Mientras que TLR2 reconoce LPS cilíndrico, el LPS cónico estimula a las células sólo mediante TLR4.³⁸ La capacidad para diferenciar variaciones en la composición molecular y la conformación tridimensional del lípido A de los LPS explica la activación de los diferentes canales de señalización mediados por los TLR.

TLR5

Reconoce la flagelina de bacterias gramnegativas.⁵⁵ Se identificó al observar que la flagelina —proteína principal de los flagelos de bacterias gramnegativas— al

TLR7

This receptor recognizes synthetic components considered immunomodulators like those derived of imidazoquinoline, loxoribine and bropirimine, which have antiviral capacity because they induce production of pro-inflammatory cytokines, especially IFN- α .^{23,60} When using TLR7-deficient mice, Hemmi *et al.*⁶⁰ observed that the stimulation with these compounds did not induce production of pro-inflammatory cytokines by macrophages nor dendritic cell maturation. Recently, and according with these initial findings, it has been informed that TLR7 recognizes single-stranded RNA (ssRNA) with high guanosine and uridine concentrations. Similar findings were found using ssRNA from the influenza virus, which is also rich in uridine.⁶²

TLR8

TLR8 belongs to the TLR9²³ subfamily and, together with TLR7, it also recognizes antiviral compounds. Although murine TLR7 recognizes ssRNA, it was recently shown that this function is carried out by TLR8 in humans.⁶¹ The implications of these findings are important because whereas TLR3 recognizes double stranded RNA in some viruses, TLR7 and TLR8 are in charge of recognizing single stranded viral RNA, as well as host RNA, which implicates them in autoimmune diseases. Studies in this new line of investigation could discover treatments for many autoimmune diseases and the identification of adjuvants that potentiate antiviral responses.⁶³

TLR9

It is essential for the recognition of unmethylated CpG motifs from bacterial DNA.^{64,65} CpG motifs are hexamers chains formed by central, unmethylated CG dinucleotides flanked by two pyrimidines in position 5' and two purines in the 3' position.⁶⁶ These unmethylated dinucleotides are frequent in DNA from microbes, including bacteria and protozoa.^{64,66} Importantly, other DNA from non-vertebrate organisms like insects, yeast and mollusks also contain unmethylated CpG motifs and are potent lymphocyte B mitogens,⁶⁷ probably through TLR9. Mammalian DNA is characterized for having a low frequency of CG dinucleotides and the majority of them are methylated, making them unable to induce immune responses. In humans, TLR9 is expressed by plasmacytoid dendritic cells and B cells and this correlates with the capacity of these cells to respond to the presence of CpG oligonucleotides,⁶⁸ whereas in mice, TLR9 is found in myeloid dendritic cells, macrophages and B cells.⁶⁴ It has been shown that in mice TLR9 is essential to mediate the anti-inflammatory effects characteristics of the probiotics.⁶⁹

contactar las superficies epiteliales basolaterales del intestino, estimula la producción de respuestas inmunitarias inflamatorias; cuando aquella hace contacto con la superficie apical no hay tal respuesta. Las investigaciones con inmunolocalización demostraron que TLR5 se expresa sólo en la superficie basolateral del epitelio intestinal y al contacto con flagelina de *Salmonella* desencadena una cascada de señalización que media el factor de transcripción proinflamatorio NF- κ B.⁵⁶ La flagelina es un patrón molecular de patógenos muy conservado, pues en plantas esta proteína induce una respuesta inmunitaria mediada por un receptor transmembranal con un dominio rico en leucinas, que es característico de los receptores tipo Toll.⁵⁷

TLR6

El TLR6 de humano tiene 69% de identidad con TLR1, y en ratones se expresa en timo, bazo, ovario y pulmón.¹⁸ Mientras que TLR2 reconoce lipoproteínas bacterianas triaciladas, TLR6 reconoce sólo lipoproteínas diaciladas como las producidas por micoplasmas, que son potentes activadores de macrófagos.⁵⁸ TLR6 actúa de manera sinérgica con TLR2 para reconocer peptidoglicanos, que son componentes de bacterias grampositivas.⁵⁹

TLR7

Este receptor reconoce compuestos sintéticos considerados inmunomoduladores como los derivados de la imidazoquinolina, además de loxoribina y bropirimina, que tienen capacidad antiviral debido a que inducen la producción de citoquinas proinflamatorias, en especial INF- α .^{23,60} Al utilizar ratones que no expresan TLR7, Hemmi *et al.*⁶⁰ observaron que la estimulación con estos compuestos no inducía la producción de citoquinas proinflamatorias por macrófagos ni la maduración de células dendríticas. Recientemente y de acuerdo con estos hallazgos iniciales, se ha informado que TLR7 reconoce ARN de cadena única (ssARN) con concentraciones elevadas de los nucleosidos guanosina y uridina.⁶¹ Hallazgos similares se encontraron utilizando ssARN del virus de la influenza, que también es rico en uridina.⁶²

TLR8

El TLR8 pertenece a la subfamilia del TLR9²³ y junto con TLR7 también reconoce compuestos antivirales. Mientras que TLR7 murino reconoce ssARN, recientemente se demostró que esta función en humanos es realizada por TLR8.⁶¹ Las implicaciones de estos hallazgos son importantes porque mientras que TLR3 reconoce el

Therefore, the discriminatory effect of TLR9 explains the capacity of the mammalian immune system to get activated in the presence of microbial DNA, compared with the absence of response in the presence of DNA from the organism.

TLR10

TLR10 is phylogenetically related with TLR1 and TLR6. It is unknown the ligand for this receptor and it is preferentially expressed in B cells from immune tissues like the spleen, lymphatic nodes and thymus.^{20,68,70}

TLR11

This TLR was recently discovered in mice and the phylogenetic analysis classify it in a subgroup together with TLR5. On the other hand, in humans TLR11 could not be expressed, because the sequences, analyzed up to date, show termination codons inside the open reading frame of this gene. TLR11 is strongly expressed in epithelial cells in the kidney and bladder and in a lower quantity in cells of the liver. TLR11 does not recognize any of the ligands that activate the rest of the TLRs; therefore, it is unique in its pattern of expression and recognition compared with other TLR. Interestingly, uropathogenic bacteria stimulated the activation of the transcription factor NF- κ B through TLR11 and TLR11 deficient transgenic mice showed ten thousand times more bacteria in kidney compared with normal mice.²² All this underscores the biological importance of TLR11 in immunity of the kidney against urinary infections.

Role of TLR in the immune response.

TLR comprise the PRR that are expressed on the cell surface, they activate the signaling pathways that induce antimicrobial and inflammatory immune responses when recognizing the PAMPs. The activation of TLR expressed in specialized antigen presenting cells (APC) like dendritic cells, perform a critical role in initiating adaptive immune responses.⁷¹ TLR activation induces the cell to express antigenic peptides on the cell surface, which are bound to major histocompatibility complex (MHC) molecules and activate antigen-specific T cells. Self peptides expressed and presented by APC are not recognized as foreign antigen, because self peptide-specific T cells are eliminated during negative selection in the thymus. In this way, negative selection and microbial induction of co-stimulatory molecules together, ensure that the adaptive immune response be generated against infectious pathogens, but not against self antigens.⁷¹

ARN de doble cadena en algunos virus, TLR7 y TLR8 se encargan de reconocer el ARN de virus de cadena única, así como posiblemente ARN del mismo hospedero, lo cual los implica en posibles enfermedades autoinmunes. Estudios en esta nueva línea de investigación podrían encontrar tratamientos para muchas enfermedades autoinmunes y a la identificación de adyuvantes que sean potenciadores de la respuesta antiviral.⁶³

TLR9

Es esencial para el reconocimiento de motivos CpG no metilados de ADN bacteriano.^{64,65} Los motivos CpG son cadenas hexámeras formadas por dinucleótidos centrales CG no metilados flanqueados por dos pirimidinas en posición 5' y dos purinas en la región 3'.⁶⁶ Estos dinucleótidos no metilados son frecuentes en el ADN de microorganismos, incluyendo bacterias y protozoarios.^{64,66} De manera relevante, otros ADN de organismos no vertebrados, como insectos, levaduras y moluscos, también contienen motivos CpG no metilados y son potentes mitógenos de linfocitos B,⁶⁷ muy probablemente a través del TLR9. Por su parte, el ADN de mamíferos se caracteriza por tener una baja frecuencia de dinucleótidos CG y la mayoría de ellos están metilados, haciéndolos incapaces de inducir respuestas inmunitarias. En humanos, TLR9 es expresado por células dendríticas plasmacitoides y células B, y esto correlaciona con la capacidad de estas células de responder a la presencia de oligonucleótidos CpG;⁶⁸ mientras que en ratones, el TLR9 se encuentra en células dendríticas mieloides, macrófagos y células B.⁶⁴ Se ha demostrado que en ratones el TLR9 es esencial para mediar los efectos antiinflamatorios característicos de los probióticos.⁶⁹ Por tanto, el efecto discriminatorio de TLR9 explica la capacidad del sistema inmunitario de los mamíferos de activarse ante presencia de ADN microbiano, comparado con la nula respuesta ante presencia del ADN del propio organismo.

TLR10

El TLR10 está filogenéticamente relacionado con el TLR1 y TLR6.²⁰ Se desconoce cuál es el ligando de este receptor que se expresa preferentemente en linfocitos B de tejidos inmunitarios, como bazo, nódulos linfáticos y timo.^{20,68,70}

TLR11

Este TLR fue recientemente descubierto en ratón y los análisis filogenéticos lo clasifican en un subgrupo junto con el TLR5.²² Por otro lado, en humanos el TLR11 podría no expresarse, ya que las

Cells of the immune system use multiple TLR and other PRR to detect simultaneously several structures of a microbe; in this way, information on a particular microbe is sent to the cell, allowing the generation of slightly different responses but with a high degree of specificity. As it was mentioned before, TLR activation favors not only the induction of inflammatory responses; it also provokes an adaptive immune response, which is antigen-specific.²³

Certain TLR can detect individual characteristics, which are common to different types of microbes. For example, TLR4 together with TLR5 detect a gram-negative flagellated organism, whereas TLR5 together with TLR2 and TLR6 detect a gram-positive organism (figure 1).⁷² The final result of this surprising capacity of discrimination is the expression of cytokines and other activating molecules by cells of the adaptive immune response, directing then, the offensive against the invasive organism.

TLR Identified in domestic animals.

The study of Toll like receptors in domestic animals is more recent and limited in comparison to investigations carried out in mice and humans. Table 1 shows some of the findings obtained in TLR discovered up to date in domestic animals.

TLR in chicken cells

The chTLR2 receptor (chTLR type 2), recently cloned, discriminates two PAMP: LPS and lipoprotein, which correspond to TLR2 and TLR4 recognition in mammals.⁷³ It is also known that nitric oxide production (NO) by macrophages from chickens with different genetic constitution (hypo or hyper-responder), differs in TLR4 expression, but not in CD14 expression.⁷⁴ In a later study, it was suggested that a stronger signal mediated by LPS through CD14, TLR4 and NF- κ B is responsible for the increase in the induction of the gene iNOS in macrophages of the hyper-responder chicken strain compared with the hyporesponder strain.⁷⁵ Moreover, data from a study using chicken heterophils suggest that TLR2 and TLR4 mediate the oxidative burst induced by LPS, while CD14 and TLR2 mediate the oxidative burst induced by lipoteichoic acid (LTA) in such cells.⁷⁶

TLR in bovine cells

By using RT-PCR, BoTLR2 and BoTLR4 mRNAs, monocytes, macrophages and dendritic cells⁷⁷ were detected in bovine. When comparing the ability of bovine macrophages (Mac) and dendritic cells (DC) to express TLR and to respond to distinct ligands of

secuencias analizadas a la fecha muestran codones de terminación dentro del marco de lectura abierto del gen. El TLR11 se expresa fuertemente en células epiteliales del riñón y la vejiga, y en menor cantidad en células del hígado. El TLR11 no reconoce ninguno de los ligandos que activan los demás TLR, por lo que es distinto en cuanto a su patrón de expresión y de reconocimiento comparado con otros TLR. De manera interesante, bacterias uropatógenas estimularon la activación del factor de transcripción NF- κ B a través del TLR11 y ratones transgénicos que no lo expresaban mostraron diez mil veces más bacterias en el riñón que los ratones normales.²² Todo esto resalta la importancia biológica del TLR11 en la inmunidad del riñón contra infecciones urinarias.

Función de los TLR en la respuesta inmunitaria

Los TLR que comprenden la clase de RRP expresados en la superficie celular, activan vías de señalización que inducen respuestas efectoras antimicrobianas y de inflamación al reconocer los PAMP. La activación de los TLR expresados en células presentadoras de antígeno (CPA) especializadas como las células dendríticas, desempeñan un papel crucial en la iniciación de respuestas inmunitarias adaptativas.⁷¹ La activación de los TLR de una CPA provoca que esta célula exprese péptidos antigénicos sobre su superficie celular, que están unidos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y activan células T específicas de antígeno. Los péptidos propios expresados y presentados por las CPA no son reconocidos como extraños, porque las células T específicas para estos péptidos son eliminadas durante la selección negativa en el timo. De esta manera, la selección negativa y la inducción microbiana de moléculas coestimuladoras juntas, aseguran que la respuesta inmunitaria adaptativa sea generada contra patógenos infecciosos, pero no contra antígenos propios.⁷¹

Las células inmunitarias utilizan múltiples TLR y otros RRP para detectar simultáneamente varias estructuras de un microbio; de esta manera, la información sobre un microbio en particular se envía a la célula, permitiendo la generación de respuestas ligeramente diferentes, pero con alto grado de especificidad. Como ya se ha señalado, la activación de los TLR propicia no sólo la inducción de respuestas inflamatorias, también provoca una respuesta inmunitaria adaptativa antígeno-específica.²³

Determinados TLR pueden detectar características individuales que son comunes a diferentes clases de

TLR, it suggests that the two cell types (both derived from monocytes) show differences in TLR expression, especially TLR2. In the same study, it was observed that both Mac and DC responded to TLR ligands by producing TNF, but DC produced more IL-12, while Mac produced more IL-10.⁷⁷

Although it has not been determined, it has been suggested that the CpG DNA could stimulate bovine dendritic cells through TLR9, as it has been described for B lymphocytes, macrophages and dendritic cells in other species.⁷⁸ In bovines, it has been observed that CpG motifs induce cellular immune responses characterized for inducing proliferation of B cells, IL-12 and INF- γ ; ^{79,80} the generation of specific antibodies against bovine TLR will be necessary to discover the receptors involved in these responses.⁸¹

TLR in swine cells

It has been informed of an elevated expression of TLR2 in swine mononuclear cells induced to endotoxic lethal shock by infusion of a high LPS dose. In this study, a human TLR2 probe was used because hTLR2 is highly homologue among species, opposite to TLR4, for which homology among species is relatively low.⁸² On the other hand, sTLR9 was identified in Peyer patches and mesenteric lymphatic nodes of

microbios. Por ejemplo, TLR4 junto con TLR5 detectan un organismo flagelado gramnegativo, mientras que TLR5 junto con TLR2 y TLR6 detectan un organismo grampositivo (Figura 1).⁷² El resultado final de esta sorprendente capacidad de tipificación es la expresión de citoquinas y otras moléculas activadoras de las células de la respuesta inmunitaria adaptativa, dirigiendo entonces la ofensiva hacia el microorganismo invasor.

TLR identificados en animales domésticos

El estudio de los receptores tipo Toll en animales domésticos es más reciente y limitado en comparación con las investigaciones realizadas en ratones y humanos. En el Cuadro 1 se indican algunos de los hallazgos obtenidos en los TLR encontrados a la fecha en animales domésticos.

TLR en células de la gallina doméstica

El receptor chTLR2 (chTLR2, tipo2), recientemente clonado, discrimina dos PAMP: LPS y lipoproteínas, que corresponden al reconocimiento por los TLR2 y TLR4 de los mamíferos.⁷³ También se ha informado que la producción de óxido nítrico (NO) por macrófa-

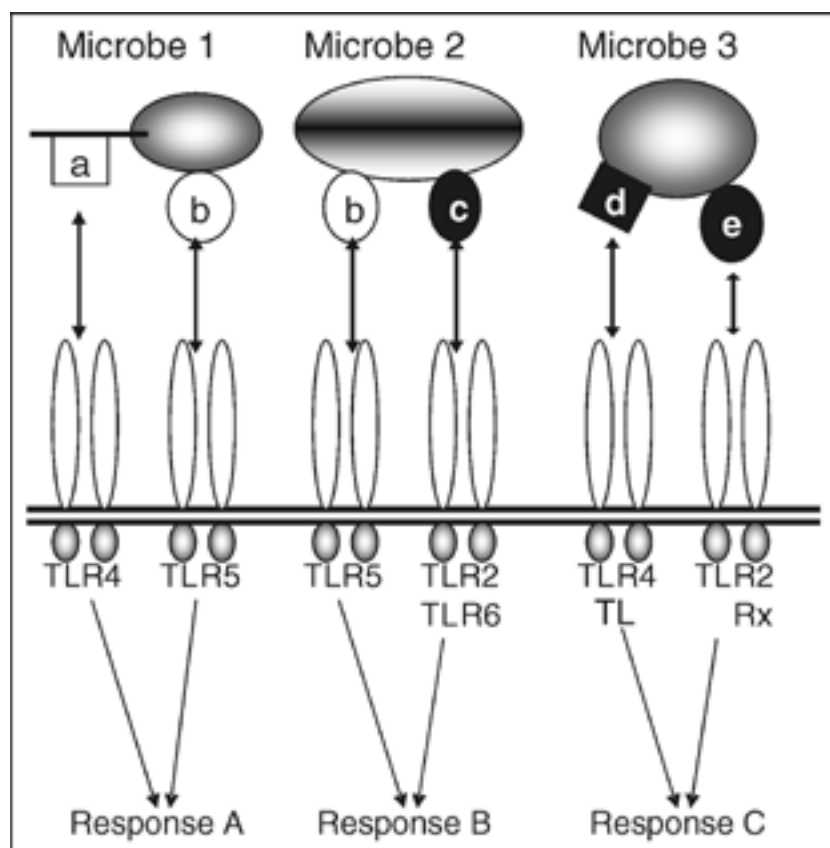


Figura 1. Modelo de reconocimiento de microbios por los receptores tipo-Toll (TLR). Modificado de Underhill y Ozinsky.⁷²

Figure 1. Model of microbial recognition by Toll-like receptors (TLR). Modified from Underhill and Ozinsky.⁷²

Cuadro 1
RECEPTORES TIPO TOLL IDENTIFICADOS EN ANIMALES DOMÉSTICOS
TOLL LIKE RECEPTORS IDENTIFIED IN DOMESTIC ANIMALS

<i>Species</i>	<i>Receptor</i>	<i>Observations</i>	<i>References</i>
Domestic chicken	chTLR2	A cloned receptor, the ChTLR2 type 2, carries out functions of TLR2 and TLR4 from mammals	73
Domestic chicken	chTLR4	Its expression in macrophages determines a higher or lower reactivity to LPS.	74, 75
Bovine	BoTLR2	Determined by RT-PCR and mRNA in monocytes, macrophages and dendritic cells	81
Bovine	BoTLR4	Determined by RT-PCR and mRNA in monocytes, macrophages and dendritic cells	81
Swine	TLR2	Determined by mRNA with a hTLR2 probe in mononuclear cells from peripheral blood	82
Swine	sTLR9	cDNA which codifies sTLR9 was isolated from Peyer's patches from gut associated lymphoid tissue (GALT)	83
Dog	TLR4	It is expressed in an important way in leukocytes from peripheral blood.	84
Cat	TLR4	It is expressed in an important way in leukocytes from peripheral blood. lung and bladder	84

swine and expression in these tissues is three times higher than in the spleen.⁸³ When compared to other species this receptor showed a higher amino acid identity with humans (81.8%) and cats (86.7%) than with mice (74.9%); notably, sTLR9 recognizes CpG motifs and for this reason it is supposed to have a similar role to that of hTLR9.⁸³

TLR in dog cells

For its ability to identify LPS in humans and mice, it is believed that in dogs, TLR4 can be fundamental to protect them against bacterial infections. It has been shown that in dogs, TLR4 receptor is expressed in a substantial way in peripheral blood leucocytes and in medium and low levels in the spleen, small intestine, stomach and liver.⁸⁴

TLR in cat cells

In the cat, as in the dog, TLR4 is expressed in peripheral blood leukocytes besides the lung and bladder.⁸⁴ When TLR4 cDNA from cats and dogs was compared, the receptor similarity was 83.6% at the nucleotide sequence level, and 77.6% at the amino acid sequence level. When TLR4 from dog and cat was compared

gos de pollo con diferente constitución genética (cepa hipo o hiper-respondedora), difiere en la expresión de TLR4, pero no en la de las moléculas CD14.⁷⁴ En un estudio posterior se sugirió que una señal más fuerte mediada por LPS vía CD14, TLR4 y NF- κ B es responsable del incremento de la inducción del gene iNOS en los macrófagos de la cepa hiper-respondedora de pollos en comparación con la cepa hipo-respondedora.⁷⁵ Asimismo, los datos obtenidos en un estudio con heterófilos de pollo sugieren que TLR2 y TLR4 median el estallido respiratorio estimulado por LPS, mientras que CD14 y TLR2 median el estallido respiratorio estimulado por el ácido lipoteicoico (LTA) en dichas células.⁷⁶

TLR en células de bovino

Por medio de la técnica de RT-PCR se detectaron mRNA de BoTLR2 y BoTLR4 en monocitos, macrófagos y células dendríticas de bovino.⁷⁷ Al comparar la habilidad de macrófagos (Mac) y células dendríticas (CD) de bovino para expresar TLR y responder a distintos ligandos de TLR, sugieren que los dos tipos de células (ambas derivadas de monocitos) muestran diferencias en la expresión de TLR, especialmente de TLR2. En ese mismo estudio se observó que tanto Mac

to the amino acid level with that of other species, sequence similarities of approximately 62-78% were observed with TLR4 from *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Bos Taurus* and *Equus caballus*.⁸⁴ On this matter, it is worth mentioning that it has not been explored if TLR distribution shows variations among species and could be of paramount importance to investigate TLR expression in TLR in the same specie before trying to compare different species, taking into account the recent demonstration that tissular expression of TLR in humans⁸⁵ varies.

Final Remarks

It has been pointed out that the next generation of vaccines in veterinary will be constituted by inactivated pathogenic microorganisms or their subunits, which, due to their lower immunogenic capacity, demand an urgent necessity to develop new and better adjuvants.⁸⁶ These adjuvants, not only should potentiate the immune response -humoral and cellular-, but also direct it to generate a protective immune response against the specific infectious agent. In this context, the discovery and analysis of TLR can lead to the development of such adjuvants. Results from different investigations suggest that the immunostimulatory capacity of some adjuvants is carried out through TLR. Such is the case of Freund Complete Adjuvant, a potent adjuvant which contains a mixture of mycobacterial components;⁸⁷ or CpG DNA, another potent adjuvant which is recognized by TLR9;^{88,89} porins from *Neisseria*, used as adjuvant in several vaccine formulations, recognized by TLR2; the cellular wall of *Mycobacterium bovis* (BCG-CWS), which is used as adjuvant in cancer immunotherapy,⁹⁰ and is recognized by TLR2 and TLR4.⁹¹ Synthetic adjuvants like MPL (a safe and effective adjuvant for vaccine use) and Ribi 529 stimulate the immune system through TLR4.⁹² In this sense, it has been indicated that an adjuvant alerts the immune system of the host through a similar mechanism to that of an infection caused by a pathogenic microorganism, which involves the interaction with a TLR followed by a "danger signal" for the immune system. Following this, cytokine secretion and regulation of costimulatory molecules induced by the innate immunity, shape the magnitude and quality of the adaptive immune response.⁹³

According to this, it has been shown that the immunostimulatory bacteria *Lactobacillus casei*, contains lipoteichoic acids recognized by TLR2⁹⁴ and CpG motifs recognized by TLR9,⁶⁹ it also induces an unspecific protective response against infection by *Eimeria* species in broilers⁹⁵ and specific against the infection by *Trichinella spiralis* in mice, when it is used as adjuvant with antigens from infective larvae of the parasite.⁹⁶

como CD respondieron a los ligandos de TLR con la producción de TNF, pero las CD produjeron más IL-12, mientras que los Mac produjeron más IL-10.⁷⁷

Aunque no se ha determinado, se ha sugerido que el CpG DNA podría estimular células dendríticas de bovino vía TLR9, como se ha descrito para linfocitos B, macrófagos de bovino y para células dendríticas de otras especies.⁷⁸ En bovinos se ha visto que motivos CpG inducen respuestas inmunitarias celulares caracterizadas por inducir proliferación de células B, producción de IL-12 e INF- γ ;^{79,80} será necesaria la generación de anticuerpos específicos de TLR de bovino para conocer los receptores involucrados en estas respuestas.⁸¹

TLR en células de cerdo

Se ha informado una expresión elevada de TLR2 en células mononucleares de cerdo sometidos a choque letal endotóxico por la infusión de una dosis alta de LPS. En este estudio se utilizó una sonda de hTLR2 porque TLR2 es altamente homólogo entre especies, al contrario de TLR4, para el cual la homología entre especies es relativamente baja.⁸² Por su parte, sTLR9 se identificó en placas de Peyer y en ganglios linfáticos mesentéricos de cerdo y la expresión en estos tejidos es tres veces más alta que en el bazo.⁸³ Al compararlo con otras especies, este receptor mostró una identidad de aminoácidos más alta con humanos (81.8%) y gatos (86.7%) que con ratones (74.9%); de manera notable, el sTLR9 reconoce motivos CpG, por lo que se supone que tiene un papel similar al del hTLR.⁸³

TLR en células de perro

Por su capacidad para identificar LPS en humanos y ratones, se cree que en perros el TLR4 puede ser fundamental para protegerlos contra infecciones bacterianas. Se ha informado que en perros el receptor TLR4 se expresa de manera relevante en leucocitos de sangre periférica y en niveles medios a bajos en bazo, intestino delgado, estómago e hígado.⁸⁴

TLR en células de gato

En el gato, como en el perro, TLR4 se expresa en leucocitos de sangre periférica, además del pulmón y la vejiga.⁸⁴ Cuando se comparó el cDNA del TLR4 de perro y el TLR4 de gato, la similaridad del receptor fue de 83.6% a nivel de la secuencia de nucleótidos, y de 77.6% a nivel de la secuencia de aminoácidos. Cuando se compararon el TLR4 de perro y el TLR4 de gato, a nivel de la secuencia de aminoácidos, con el de otras especies, se observaron similitudes de secuencia de aproximadamente 62%-78% con los TLR4 de

Although the role of TLR in these studies is still to be shown, the data suggest that the immunostimulatory or adjuvant effect of *L. casei* in the control of diseases of domestic animals can be mediated mostly by these receptors, which opens a new field in the control of infectious diseases in veterinary medicine.

Thus, a better understanding of TLR and their role in the immune response in each of the species of domestic animals, as well as of the components of immunostimulatory substances (for example, *L. casei*), will allow the development of better adjuvants for their use in vaccines able to induce faster, specific, stronger and long-lasting responses, this in veterinary and human medicine in the next years.

Referencias

1. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:197-216.
2. Janeway CA Jr. How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect* 2001; 3:1167-71.
3. Strieter RM, Belperio JA and Keane MP. Cytokines in innate host defense in the lung. *J Clin Invest* 2002; 109:699-705.
4. McGuinness DH, Dehal PK, Pleass RJ. Pattern recognition molecules and innate immunity to parasites. *Trends Parasitol* 2003; 19:312-9.
5. Teixeira MM, Almeida IC, Gazzinelli RT. Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites. *Microbes Infect* 2002; 4:883-6.
6. Latz E, Golenbock DT. Receptor "cross talk" in innate immunity. *J Clin Invest*. 2003; 112:1136-7.
7. Janeway CA Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1989; 54(Pt 1):1-13.
8. Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997; 91:295-8.
9. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001; 1:135-45.
10. Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988; 52:269-79.
11. Gay NJ, Keith FJ. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature* 1991; 351:355-6.
12. Wasserman SA. A conserved signal transduction pathway regulating the activity of the rel-like proteins dorsal and NF-kappa B. *Mol Biol Cell* 1993; 4:767-71.
13. Morisato D, Anderson KV. The spatzie gene encodes a component of the extracellular signaling pathway establishing the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo. *Cell* 1994; 76:677-88.
14. Belvin MP, Anderson KV. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996; 12:393-416.
15. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette

Homo sapiens, *Mus musculus*, *Bos taurus* y *Equus caballus*, respectivamente.⁸⁴ Al respecto, cabe señalar que no se ha explorado bien si la distribución de los TLR muestra variaciones de especie y podría ser de gran importancia investigar la expresión de los TLR en una misma especie antes de tratar de comparar diferentes especies, tomando en cuenta la demostración reciente de que la expresión tisular de los TLR en humanos varía.⁸⁵

Consideraciones finales

Se ha señalado que la próxima generación de vacunas de uso veterinario estará constituida por microorganismos patógenos inactivados o por sus subunidades, las cuales por su baja capacidad inmunogénica exigen la necesidad urgente de desarrollar nuevos y mejores adyuvantes.⁸⁶ Estos adyuvantes, además de potenciar la respuesta inmunitaria —humoral y celular—, deberán dirigirla para generar una respuesta inmunitaria protectora contra el agente infeccioso específico. En este contexto, el descubrimiento y análisis de los TLR puede propiciar el desarrollo de dichos adyuvantes. Los resultados de diferentes investigaciones sugieren que la capacidad inmunoestimulante de algunos adyuvantes se lleva a cabo a través de los TLR. Tal es el caso del adyuvante completo de Freund, un potente adyuvante que contiene una mezcla de componentes micobacterianos,⁸⁷ del CpG DNA, otro potente adyuvante que es reconocido por TLR9;^{88,89} las porinas de *Neisseria*, utilizadas como adyuvante en varias formulaciones vacunales, son reconocidas por TLR2;³⁴ la pared celular de la cepa BCG de *Mycobacterium bovis* (BCG-CWS), que se usa como adyuvante para la inmunoterapia del cáncer,⁹⁰ es reconocida por TLR2 y TLR4.⁹¹ Los adyuvantes sintéticos MPL (adyuvante seguro y efectivo para su uso en vacunas) y Ribi 529 estimulan el sistema inmunitario a través de TLR4.⁹² En este sentido, se ha indicado que un adyuvante alerta el sistema inmune del hospedero a través de un mecanismo similar al de una infección provocada por un microorganismo patógeno, que involucra la interacción con un TLR seguido de una "señal de peligro" para el sistema inmunitario. A continuación, la secreción de citoquinas y la regulación de las moléculas coestimuladoras inducidas por la inmunidad innata, moldean la magnitud y calidad de la respuesta inmune adaptativa.⁹³

En relación con lo anterior, se ha informado que la bacteria inmunoestimulante *Lactobacillus casei*, que contiene ácidos lipoteicoicos reconocidos por el TLR2⁹⁴ y motivos CpG reconocidos por el TLR9,⁶⁹ induce una respuesta protectora inespecífica contra

- spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. Cell 1996; 86:973-83.
16. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature 1997; 388:394-7.
 17. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95:588-93.
 18. Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA *et al.* TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. Gene 1999; 231:59-65.
 19. Chuang TH, Ulevitch RJ. Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. Eur Cytokine Netw 2000; 11:372-8.
 20. Chuang T, Ulevitch RJ. Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. Biochim Biophys Acta 2001; 1518:157-61.
 21. Du X, Poltorak A, Wei Y, Beutler B. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. Eur Cytokine Netw 2000; 11:362-71.
 22. Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA *et al.* A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. Science 2004; 303:1522-1526.
 23. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. Annu Rev Immunol 2003; 21:335-76.
 24. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z *et al.* Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. J Immunol. 2002 169:10-14.
 25. Wyllie DH, Kiss-Toth E, Visintin A, Smith SC, Boussof S, Segal DM *et al.* Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. J Immunol 2000; 165:7125-32.
 26. Alexopoulou L, Thomas V, Schnare M, Lobet Y, Anguita J, Schoen RT *et al.* Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. Nat Med 2002; 8:878-84.
 27. Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW *et al.* Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. J Biol Chem 1999; 274:33419-25.
 28. Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. J Biol Chem 1999; 274:17406-9.
 29. Lehner MD, Morath S, Michelsen KS, Schumann RR, Hartung T. Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-R like receptors independent of paracrine mediators. J Immunol 2001; 166:5161-7.
 30. Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proin-

la infección por especies de *Eimeria* en pollos de engorda⁹⁵ y específica contra la infección por *Trichinella spiralis* en ratones, cuando se utiliza como adyuvantes con antígenos de larvas infectivas del parásito.⁹⁶ Aunque el papel de los TLR en estos estudios está por demostrarse, los datos sugieren que el efecto inmunestimulante o de adyuvante del *Lactobacillus casei* en el control de enfermedades en los animales domésticos puede estar mediado en gran medida por estos receptores, lo que abre un campo nuevo en el control de enfermedades infecciosas en medicina veterinaria.

Con base en lo anterior, el mejor conocimiento de los TLR y su papel en la respuesta inmunitaria en cada una de las especies de animales domésticos, así como de los componentes de sustancias inmunestimulantes (por ejemplo, *L. casei*), permitirá el desarrollo de mejores adyuvantes para su uso en vacunas que induzcan respuestas más rápidas, específicas, más fuertes y de más larga duración, en medicina veterinaria y en medicina humana, en los próximos años.

flammatory signaling in macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96:14459-63.

31. Hajjar AM, O'Mahony DS, Ozinsky A, Underhill DM, Aderem A, Klebanoff SJ *et al.* Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. J Immunol 2001; 166:15-9.
32. Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procopio DO *et al.* Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. J Immunol 2001; 167:416-23.
33. Opitz B, Schroder NW, Spreitzer I, Michelsen KS, Kirschning CJ, Hallatschek W *et al.* Toll-like receptor-2 mediates *Treponema* glycolipid and lipoteichoic acid-induced NF-kappaB translocation. J Biol Chem 2001; 276:22041-7.
34. Massari P, Henneke P, Ho Y, Latz E, Golenbock DT, Wetzler LM. Cutting edge: Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. J Immunol 2002; 168:1533-7.
35. Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M *et al.* The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. Nature 1999; 401:811-5.
36. Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Saint Girons I *et al.* Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. Nat Immunol 2001; 2:346-52.
37. Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, Salkowski CA, Cody MJ, Ward DC *et al.* Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. Infect Immun 2001; 69:1477-

38. Netea MG, van Deuren M, Kullberg BJ, Cavaillon JM, Van der Meer JW. Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors? *Trends Immunol* 2002; 23:135-139.
39. Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* 2002; 277:15107-1512.
40. O'Neill LA. Toll-like receptor signal transduction and the tailoring of innate immunity: a role for Mal? *Trends Immunol* 2002; 23:296-300.
41. Rehli M. Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. *Trends Immunol* 2002; 23:375-378.
42. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413:732-738.
43. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'Amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R *et al.* Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 2000; 164:5998-6004.
44. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y *et al.* Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999; 162:3749-52.
45. Byrd-Leifer CA, Block EF, Takeda K, Akira S, Ding A. The role of MyD88 and TLR4 in the LPS-mimetic activity of Taxol. *Eur J Immunol* 2001; 31:2448-2457.
46. Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA *et al.* Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 2000; 1:398-401.
47. Rassa JC, Meyers JL, Zhang Y, Kudravalli R, Ross SR. Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:2281-2286.
48. Bulut Y, Faure E, Thomas L, Karahashi H, Michelsen KS, Equils O *et al.* Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway. *J Immunol* 2002; 168:1435-1440.
49. Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 2000; 164:558-561.
50. Dybdahl B, Wahba A, Lien E, Flo TH, Waage A, Qureshi N *et al.* Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. *Circulation* 2002; 105:685-690.
51. Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J *et al.* The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2001; 276:10229-10233.
52. Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T *et al.* Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* 2002; 195:99-111.
53. 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; 168:5233-5239.
54. Smiley ST, King JA, Hancock WW. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* 2001; 167:2887-2894.
55. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR *et al.* The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001; 410:1099-1103.
56. Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* 2001; 167:1882-1885.
57. Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L *et al.* MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* 2002; 415:977-983.
58. Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A *et al.* Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 2001; 13:933-940.
59. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB *et al.* The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:13766-13771.
60. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K *et al.* Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 2002; 3:196-200.
61. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S *et al.* Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004; 303:1526-1529.
62. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis ESC. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*. 2004; 303:1529-1531.
63. O'Neill LA. Immunology. After the toll rush. *Science* 2004; 303:1481-1482.
64. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H *et al.* A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408:740-745.
65. Ahmad-Nejad P, Hacker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* 2002; 32:1958-1968.
66. Brown WC, Corral RS. Stimulation of B lymphocytes, macrophages, and dendritic cells by protozoan DNA. *Microbes Infect* 2002; 4:969-974.
67. Sun S, Beard C, Jaenisch R, Jones P, Sprent J. Mitogenicity of DNA from different organisms for murine B

- cells. *J Immunol* 1997; 159:3119-3125.
68. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T *et al.* Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002; 168:4531-4537.
 69. Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, Hayashi T, Reinus C, Rudensky B *et al.* Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 2004; 126:520-528.
 70. Bourke E, Bosisio D, Golay J, Polentarutti N, Mantovani A. The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood* 2003; 102:956-963.
 71. Heine H, Lien E. Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 130:180-192.
 72. Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* 2002; 14:103-110.
 73. Fukui A, Inoue N, Matsumoto M, Nomura M, Yamada K, Matsuda Y *et al.* Molecular cloning and functional characterization of chicken toll-like receptors. A single chicken toll covers multiple molecular patterns. *J Biol Chem*. 2001; 276:47143-47149.
 74. Dil N, Qureshi MA. Differential expression of inducible nitric oxide synthase is associated with differential Toll-like receptor-4 expression in chicken macrophages from different genetic backgrounds. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 84:191-207.
 75. Dil N, Qureshi MA. Involvement of lipopolysaccharide related receptors and nuclear factor kappa B in differential expression of inducible nitric oxide synthase in chicken macrophages from different genetic backgrounds. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 88:149-161.
 76. Farnell MB, Crippen TL, He H, Swaggerty CL, Kogut MH. Oxidative burst mediated by toll like receptors (TLR) and CD14 on avian heterophils stimulated with bacterial toll agonists. *Dev Comp Immunol* 2003; 27:423-429.
 77. Werling D, Hope JC, Howard CJ, Jungi TW. Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists. *Immunology* 2004; 111:41-52.
 78. Shoda LK, Kegerreis KA, Suarez CE, Roditi I, Corral RS, Bertot GM *et al.* DNA from protozoan parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi*, and *T. brucei* is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide. *Infect Immun* 2001; 69:2162-2171.
 79. Zhang Y, Palmer GH, Abbott JR, Howard CJ, Hope JC, Brown WC. CpG ODN 2006 and IL-12 are comparable for priming Th1 lymphocyte and IgG responses in cattle immunized with a rickettsial outer membrane protein in alum. *Vaccine* 2003; 21:3307-3318.
 80. Zhang Y, Shoda LK, Brayton KA, Estes DM, Palmer GH, Brown WC *et al.* Induction of interleukin-6 and interleukin-12 in bovine B lymphocytes, monocytes, and macrophages by a CpG oligodeoxynucleotide (ODN 2059) containing the GTCGTT motif. *J Interferon Cytokine Res* 2001; 21:871-881.
 81. Werling D, Jungi TW. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 91:1-12.
 82. Liu Y, Wang Y, Yamakuchi M, Isowaki S, Nagata E, Kanmura Y *et al.* Upregulation of toll-like receptor 2 gene expression in macrophage response to peptidoglycan and high concentration of lipopolysaccharide is involved in NF-kappa b activation. *Infect Immun* 2001; 69:2788-2796.
 83. Shimosato T, Kitazawa H, Katoh S, Tomioka Y, Karima R, Ueha S *et al.* Swine Toll-like receptor 9(1) recognizes CpG motifs of human cell stimulant. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1627:56-61.
 84. Asahina Y, Yoshioka N, Kano R, Moritomo T, Hasegawa A. Full-length cDNA cloning of Toll-like receptor 4 in dogs and cats. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 96:159-167.
 85. Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 2002; 168:554-561.
 86. Singh M, O'Hagan DT. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Int J Parasitol* 2003; 33:469-478.
 87. Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2001; 2:947-950.
 88. Lipford GB, Heeg K, Wagner H. Bacterial DNA as immune cell activator. *Trends Microbiol* 1998; 6:496-500.
 89. Krieg AM. Immune effects and mechanisms of action of CpG motifs. *Vaccine* 2000; 19:618-622.
 90. Azuma I, Seya T. Development of immunoadjuvants for immunotherapy of cancer. *Int Immunopharmacol* 2001; 1:1249-1259.
 91. Tsuji S, Matsumoto M, Takeuchi O, Akira S, Azuma I, Hayashi A *et al.* Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll-like receptors. *Infect Immun* 2000; 68:6883-6890.
 92. Evans JT, Cluff CW, Johnson DA, Lacy MJ, Persing DH, Baldrige JR. Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPL adjuvant and Ribi.529. *Expert Rev Vaccines* 2003; 2:219-229.
 93. Jiang ZH, Koganty RR. Synthetic vaccines: the role of adjuvants in immune targeting. *Curr Med Chem* 2003; 10:1423-1439.
 94. Matsuguchi T, Takagi A, Matsuzaki T, Nagaoka M, Ishikawa K, Yokokura T *et al.* Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10:259-266.

95. Bautista Garfias C, Arriola M, Trejo L, Ixta O, Rojas RE. Comparación entre el efecto de *Lactobacillus casei* y el de una vacuna comercial en pollos contra la coccidiosis. Tec Pecu Mex 2003; 41:317-327.

96. Bautista Garfias C, Posadas A, Ixta O. Inmunización de ratones BALB/c con un antígeno de larvas musculares de *Trichinella spiralis* utilizando *Lactobacillus casei* como adyuvante. Tec Pecu Mex 2004; 35:359-368

