

Los receptores tipo Toll en el desarrollo y función del sistema hematopoyético

Eduardo Vadillo,^{*,**} Rosana Pelayo^{*}

* Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

** Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.

Toll-like receptors in development and function of the hematopoietic system

ABSTRACT

Virus, bacteria, fungi and parasites are pathogens to which individuals are constantly exposed. Pathogen recognition by cells of the immune system is carried out by a growing list of pattern-recognition receptors (PRRs) which are evolutionally conserved and absent in mammals, named pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). PRRs can be found in extracellular matrix, within cytoplasm and on cellular membranes. Among the membrane PRRs, Toll-like receptors (TLRs) induce the production of pro-inflammatory cytokines and the expression of co-stimulatory molecules upon stimulation on mature cells, resulting in the triggering of immune danger signals. Recent reports showing the regulation of hematopoiesis by TLRs, suggest that they are involved in the most primitive stages of hematopoietic development and contribute to emergent replenishment of innate immune cells. These data entail TLRs to hematopoiesis and also revolutionize our understanding of the mechanisms governing infection responses. In this review, we focus on the most relevant findings from the TLR discovery to the use of TLR agonists and antagonists in novel therapies for infectious, autoimmune and neoplastic diseases. Of special interest is the research progress in the TLR functional expression by primitive hematopoietic stem and progenitor cells.

Key words. Hematopoiesis. Early hematopoietic progenitors. Toll-like receptors (TLR). Immunotherapy.

RESUMEN

Los virus, bacterias, hongos y parásitos son agentes infecciosos a los que un individuo se encuentra constantemente expuesto. Su reconocimiento es llevado a cabo por un número creciente de receptores celulares que identifican patrones (PRRs), habitualmente ausentes en los mamíferos, llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), y son conservados estructuralmente a través de la evolución. Los PRRs pueden encontrarse en la matriz extracelular, solubles en el citoplasma y/o en membranas celulares. Entre las membranales se incluyen los receptores tipo Toll (TLRs), los cuales inducen como resultado de su estimulación la producción de citocinas proinflamatorias y la expresión de moléculas coestimuladoras en células maduras que resultan en señales de alerta inmunológica. El momento ontogénico en el que las células del sistema inmune adquieren el repertorio funcional de dichos receptores es un tema de gran interés actual, especialmente por las posibles implicaciones de su estimulación en las decisiones de los destinos celulares durante el desarrollo. Las observaciones recientes de regulación de la hematopoyesis por TLRs sugieren su participación en las etapas más tempranas de diferenciación de las células sanguíneas y, particularmente, en la contribución al reabastecimiento inmediato del sistema inmune innato bajo condiciones emergentes, revolucionando el conocimiento sobre los mecanismos de respuesta a la infección. Esta revisión presenta los hallazgos científicos más importantes desde el descubrimiento de los TLRs hasta el uso de sus agonistas y antagonistas para el tratamiento de enfermedades infecciosas, autoinmunes y neoplásicas. De especial interés es el progreso en el conocimiento de la adquisición del repertorio de los TLRs en células hematopoyéticas primitivas, troncales y progenitoras, y las consecuencias de su estimulación.

Palabras clave. Hematopoyesis. Progenitores hematopoyéticos tempranos. Receptores tipo Toll (TLR). Inmunoterapia.

INTRODUCCIÓN

La producción de células sanguíneas está determinada por la acción concertada de factores de transcripción, interacciones celulares, factores de crecimiento y citocinas, que regulan dinámicamente la expresión y/o el silenciamiento de genes de diferenciación y proliferación celular.¹ Aunque es bien conocido que la frecuencia, funcionalidad y número de dichas células en circulación pueden ser modificados durante infecciones bacterianas agudas,² los mecanismos moleculares del fenómeno comienzan a ser descifrados. Una pieza fundamental para su comprensión ha sido el descubrimiento de una variedad de receptores de la inmunidad innata, entre los que se encuentran los receptores tipo Toll (TLRs). A poco más de 20 años del descubrimiento del primero de estos receptores y su participación en la polaridad dorso-ventral de *Drosophila melanogaster*,³ hoy se reconocen como componentes fundamentales del sistema inmune, evolutivamente conservados y capaces de detectar estructuras de origen microbiano y de desencadenar respuestas inmunológicas. Su papel en el desarrollo hematopoyético es de gran interés actual, y ha revolucionado el aprendizaje de la regulación de las células troncales y progenitoras hematopoyéticas, de las que se pensaba eran inertes a componentes de agentes patógenos y han demostrado responder a ellos con cambios en la toma de decisiones de linaje. Más aún, la activación crónica de los TLRs parece participar en el desarrollo de enfermedades hematológicas, enfermedades autoinmunes y neoplásicas, debido a la producción descontrolada de mediadores de la inflamación y la alta expresión de moléculas co-estimuladoras. El uso de agonistas y antagonistas de los TLRs como moduladores terapéuticos de la respuesta inmune y la sobrevida celular ha despertado una gran expectación en el mundo biomédico en los últimos años.

RECEPTORES TIPO TOLL (TLR)

Los PRRs son una familia creciente de receptores encargados del reconocimiento de moléculas microbianas altamente conservadas en la evolución y de moléculas endógenas asociadas a daño (PAMPS y DAMPs, respectivamente). Los PRRs son codificados en línea germinal y pueden encontrarse en matriz extracelular, solubles en el citoplasma o anclados a membranas. Aunque las estructuras y funciones de algunos PRRs han sido recientemente descritas,⁴⁻⁶ en la actualidad se conoce más de los receptores tipo Toll (TLRs), capaces de reconocer

PAMPs provenientes de patógenos invasores y de algunas estructuras propias.⁷

En 1985 se descubrió el primer receptor Toll regulador de la polaridad dorso-ventral de *Drosophila melanogaster*,³ y poco más de diez años después se estableció su papel crucial en el reconocimiento de moléculas presentes en hongos,⁸ y en la inducción de síntesis de péptidos antimicrobianos⁷ tras el reto antigénico de los plasmocitos de las larvas de mosca. En mamíferos, el primer TLR descrito fue el TLR4 en 1997,⁹ iniciando una etapa científica de intensa investigación y hallazgos secuenciales que han modificado el entendimiento de los mecanismos de inmunidad innata y han abierto una gama de posibilidades para el tratamiento de diversas enfermedades. Al día de hoy se han descrito diez TLRs en humanos⁷ y 13 en ratón.¹⁰ En conjunto, todos los estudios seminales sobre TLRs, desde su descubrimiento hasta su participación en el establecimiento de respuestas innatas, marcaron su reciente distinción con el Premio Nobel de Medicina 2011.¹¹⁻¹⁴

Los TLRs son proteínas transmembranales tipo 1 que contienen entre 19 y 25 motivos ricos en repeticiones de leucinas (LRRs) en su ectodominio, una región transmembranal y una porción intra-

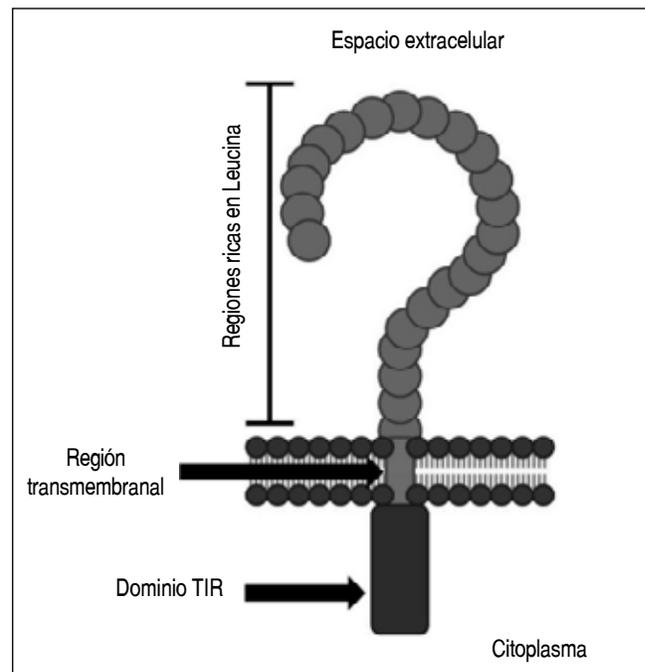


Figura 1. Estructura general de los receptores tipo Toll. Los TLRs poseen una región extracelular rica en repeticiones de leucina (LRRs), a través de la cual reconoce a sus ligandos específicos; una región transmembranal, y una región intracelular en donde se localiza el dominio TIR. Dependiendo del ligando reconocido, el dominio TIR reclutará a una proteína adaptadora para la ulterior transducción de señales.

citoplasmática con dominios TIR (Toll/receptor de IL1) que inician la señalización intracelular¹⁵ (Figura 1). Están expresados abundantemente en fibroblastos y células epiteliales, así como en células del sistema inmune, incluyendo macrófagos, células dendríticas, linfocitos B y T, y su expresión es regulada por patógenos, citocinas, factores microambientales⁷ y posiblemente por ligandos endógenos. Por su localización y el tipo de ligandos que los unen, estos receptores se han dividido en dos grandes grupos: los TLRs de membranas citoplásmicas (TLRs 1, 2, 4, 5, 6 y 10) y los TLRs de membranas endosomales (TLRs 3, 7, 8 y 9) (Figura 2). Ya sea

como monómeros o en forma de heterodímeros, cada TLR reconoce un patrón molecular distinto. El TLR4 se expresa predominantemente en células fagocíticas¹⁶ y es responsable del reconocimiento de un número de estructuras, incluyendo lipopolisacárido (LPS, el componente estructural más abundante de las bacterias Gram-negativas), mananas, glicosilinositolfosfolípidos, proteínas de cápsides virales, proteínas de fusión del virus sincicial respiratorio (RSV), pneumolisinas estreptocócicas, paclitaxel (un diperteno de las plantas) y taxol (un agente antitumoral), además de moléculas endógenas como el biglicano,¹⁷ tenacina-C,¹⁸ las proteínas

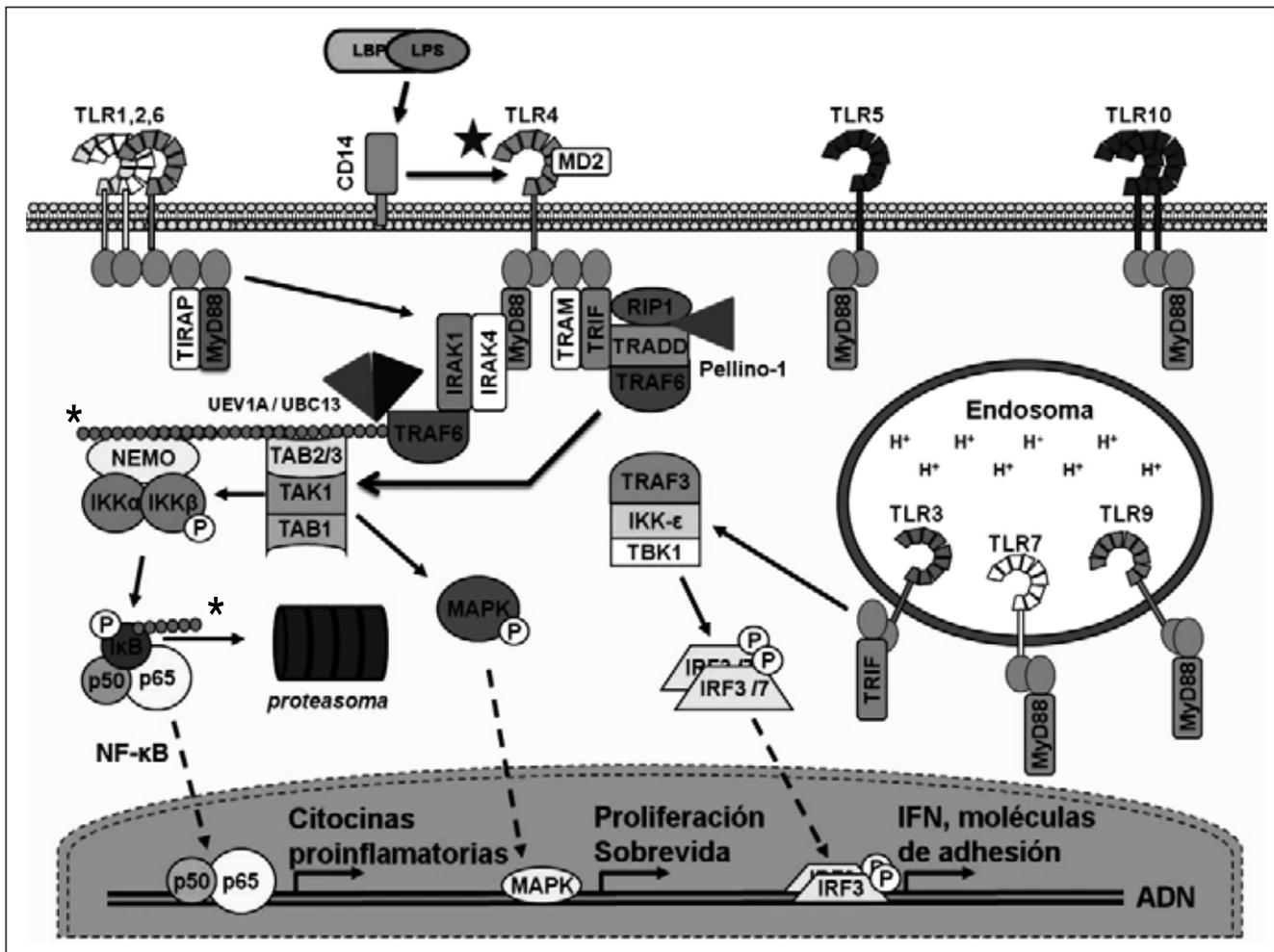


Figura 2. Vías de señalización de los TLRs. Los TLR 1, 2, 4, 5, 6 y 10 se localizan en la membrana celular, en tanto los TLR 3, 7, 8 y 9 están mayormente expresados en endosomas. Al reconocer a sus ligandos específicos los TLRs inician una cascada de señalización intracelular que puede ser dependiente o independiente de MyD88. En la vía dependiente de MyD88, TRAF6 es un factor indispensable que se ubiquitina para reclutar a los complejos TAK1 e IKK. Una vez IKK es fosforilado, inducirá la activación y translocación al núcleo de NF- κ B (p50 y p65) para promover la producción de citocinas proinflamatorias. A su vez, TAK1 activa a las MAPK, culminando en la inducción de la expresión de moléculas coestimuladoras, quimiocinas y citocinas. La vía independiente de MyD88 es iniciada por TRIF y TRAM, que provocan la activación de TBK1 y su capacidad de fosforilar a los factores IRF3 y 7 para su translocación homodimérica al núcleo, en donde impulsarán la producción de IFN. Esta vía puede también inducir la activación de NF- κ B. Los círculos pequeños alineados (★) ubiquitina.

de choque térmico de 60 y 70 kDa (HSP60 y 70), fibrinógeno, fibronectina, ácido hialurónico, heparán sulfato, elastasa del neutrófilo y lipoproteínas de baja densidad^{7,16,19} (Cuadro 1).

La función de TLR2 es reconocer peptidoglicano y porinas en las bacterias Gram-negativas, lipoarabinomanana en las Gram-positivas, fosfolipomanana en hongos, glicosilfosfatidilinositol en parásitos y hemaglutininas virales. Este receptor forma complejos heterodiméricos con TLR1 para detectar triacil lipopéptidos y a la β -defensina-3, un péptido antimicrobiano capaz de activar a monocitos y DC²⁰, o con TLR6 para reconocer diacil lipopéptidos y ácido lipoteicoico (LTA) presentes

en bacterias y zymosan. Su asociación con lectinas puede sensar ligandos del tipo β -glucanos en los hongos.^{7,16} La estructura del complejo heterodimérico formado por TLR1 y 2 con el agonista sintético Pam3CSK4 exhibe la prevalencia de interacciones hidrofóbicas con las cadenas lipídicas del agonista y su estabilización por asociación con otras proteínas.²¹ Por otro lado, el reconocimiento de las flagelinas bacterianas está a cargo de TLR5.²² Aunque la respuesta mediada por este TLR es efectiva, no todas las flagelinas tienen propiedades proinflamatorias, y algunas bacterias como *Helicobacter pylori* pueden evadir la respuesta inmune aprovechando esta característica.²³

Cuadro 1. Receptores tipo Toll.

Receptores	Ligandos exógenos	Ligandos endógenos	Localización
TLR 2/1 TLR 2/6	Pam3CSK4 Péptidoglicano Porinas Lipoarabinomanana Fosfolipomananas Glucosil fosfatidil inositol Hemaglutinina Triacil lipopéptidos Diacil lipopéptidos Ácido lipoteicoico Zymosan	Biglicano β defensina-3	Membrana celular
TLR4	Lipopolisacárido (LPS) Manana Glicosilinositol fosfolípidos Proteínas de cápside Proteínas de fusión del virus sincial respiratorio Pneumolisinas estreptococcicas Paclixatel Taxol	Biglicano tenacina-C HSP60 y 70 Fibrinógeno Fibronectina Ácido hialurónico Heparan sulfato elastasa del neutrófilo LDL	Membrana celular
TLR10	Desconocido	Desconocido	Membrana celular
TLR5	Flagelina	Desconocido	Membrana celular
TLR3	Poly I:C RNA cadena doble	RNA mensajero	Endosomas
TLR7/8	Resiquimod R848 Loxoribina ssRNA siRNA	RNA mensajero	Endosomas
TLR9	DNA con motivos CpG Hemozoina del <i>Plasmodium</i>	Complejos inmunes de IgG-cromatina	Endosomas

Los TLRs que reconocen ácidos nucleicos residen en endosomas, donde el ligando requiere ser internalizado para su identificación. El ambiente ácido y las enzimas presentes en este organelo son esenciales para la degradación del material y la óptima activación de dichos receptores. Así, el TLR3 reconoce RNA de cadena doble (dsRNA) presente en virus como el de influenza, RNA de los reovirus, intermediarios de replicación del RNA de cadena sencilla, virus sincicial respiratorio, virus de la encefalomiocarditis, virus West Nile y algunos RNA de interferencia,¹⁹ además de RNA mensajero endógeno.²⁴ Por su parte, el TLR7 reconoce RNA de cadena sencilla del virus de la estomatitis, ligandos sintéticos como poly U, algunos siRNA, imidazoquinolinas como imiquimod, resiquimod y loxoribine, además de RNA del streptococo del grupo B.²⁵ Al ser muy similar al TLR7, el TLR8 también identifica RNA de cadena sencilla y algunos RNA de interferencia.²⁶ TLR9 reconoce DNA con motivos citidina-fosfato-guanosina (CpG), típicamente intercalados en el material genético de los virus de herpes simple 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2, respectivamente) y del citomegalovirus murino (MCMV).⁷ Además, este receptor es capaz de identificar a la hemozoina de *Plasmodium*²⁷ y complejos de IgG-cromatina.²⁸ Tanto TLR7 como TLR9 son expresados en células B y células dendríticas plasmacitoides (pDCs),^{29,30} y en la mayoría de los casos su señalización induce la síntesis de IFN_{α/β}.¹⁶ TLR10 puede homodimerizarse o heterodimerizarse con TLR1 y TLR2,²⁹ aunque se desconoce la identidad de su ligando. Los genes que codifican para este receptor se han identificado en humanos pero no en ratones, lo que ha limitado su estudio. Finalmente, TLR11 murino reconoce profilina, y los TLRs 12 y 13 a la fecha permanecen como receptores huérfanos.

Señalización de los TLRs

Cuando los TLRs reconocen PAMPs, ya sea en agonistas sintéticos o en ligandos endógenos, transducen señales que culminan mayormente en la producción de citocinas proinflamatorias e interferones. Como se revisa más adelante, todos los TLRs, excepto TLR3, inducen señales a través de la proteína adaptadora MyD88, y algunos utilizan también una segunda vía, independiente de MyD88.

Posiblemente la cascada de señalización más definida a la fecha es la inducida por TLR4. En el evento de reconocimiento, el LPS liberado por bacterias Gram-negativas se acompleja con la proteína de unión a LPS (LBP) presente en el torrente sanguí-

neo e inmediatamente CD14, un glicosilfosfatidilinositol anclado a membrana celular o soluble en plasma³¹ se acopla al TLR4, donde la proteína adaptadora MD2 juega un papel fundamental en el desencadenamiento de la respuesta inflamatoria. LPS se une a MD2 a través de cinco de sus grupos acilo, mientras que el sexto queda expuesto para unirse al TLR4.³² La transducción de señales inicia con la proteína adaptadora MyD88, que debe el nombre a su descripción original en leucemia mieloide aguda M1,^{21,33} y que es la primera molécula en ser reclutada al dominio TIR del TLR en la vía dependiente de MyD88 (Figura 2). Además de MyD88, otras proteínas adaptadoras son reclutadas al dominio TIR, tal es el caso de TIRAP que ha demostrado ser indispensable para la señalización del TLR2 y TLR4 vía MyD88. Por su parte, TRIF participa en la vía independiente de MyD88 iniciada por el TLR3 endosomal e induce primordialmente la producción de interferón. Acoplado a TRIF, TRAM está vinculado a la señalización de TLR4 en la ruta independiente de MyD88.^{34,35}

Una vez que MyD88 se ha unido al dominio TIR del receptor, se recluta y activa la cinasa citoplásmica IRAK4, seguida de IRAK1 e IRAK2 (no mostrada),³⁶ lo que induce su interacción con TRAF6, una ligasa de tipo E3 que interactúa con las enzimas Ubc13 y Uev1A para formar cadenas de ubiquitina que servirán de andamio para reclutar a los complejos TAK1 e IKK, a través de TAB2/3 y NEMO, respectivamente.^{37,38} Se cree que debido a su proximidad TAK1 (miembro de la familia de las proteínas cinasas activadas por mitógenos) fosforila a IKKβ, misma que fosforila a IκB. IκB es entonces ubiquitinado y degradado en el proteasoma, dejando libre a las subunidades p50 y p65 del NF-κB para translocarse al núcleo e inducir la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL6, IL12 y TNFα.¹⁹ NF-κB puede sufrir regulación postraduccional, fenómeno en el que están implicados el AMPc y la proteína cinasa C (PKC).³⁴ A su vez TAK1 puede activar a las MAPK incluyendo a Erk1, Erk2, JNK y a p38 que activan a AP-1, el cual contribuye a la regulación de la producción de citocinas proinflamatorias y quimioquinas, así como de la proliferación y la supervivencia celular³⁹ (Figura 2).

Durante la activación de la vía independiente de MyD88, TRAM sirve como puente entre el dominio TIR y TRIF, el cual forma un complejo de señalización con TRADD, TRAF6, Pellino-1 (una ligasa de ubiquitina) y RIP1, iniciando un mecanismo mediado por ubiquitinación, similar al antes descrito.

Por otro lado, la activación de TBK1 proveniente de la señal de TLR3, requiere a TRAF3 y culmina en la translocación nuclear de homodímeros fosforilados de IRF3 e IRF7, promoviendo la expresión de genes inductores de interferón y genes que codifican para moléculas de adhesión.^{7,19}

La duración prolongada de eventos inflamatorios puede llevar a daño tisular severo, por lo que las células han desarrollado estrategias para controlar rigurosamente la producción de citocinas proinflamatorias por el reconocimiento de ligandos de TLRs. Algunas de estas estrategias incluyen la producción de variantes moleculares generadas por corte y empalme génico, íntimamente ligadas a la vía de señalización, la acción de enzimas como las ligasas de ubiquitina, y la producción de microRNAs que funcionan como moduladores negativos de la cascada de transducción de señales a distintos niveles.¹⁹ Entre las variantes moleculares está MyD88s, generada por corte y empalme del gen de MyD88 al activar monocitos con LPS. Esta proteína impide que IRAK1 sea fosforilada y con ello que la señalización sea completada.⁴⁰ Por otro lado, IRAKM es una molécula que además de impedir la disociación de MyD88 de IRAK1 e IRAK4, bloquea la interacción entre IRAK y TRAF6.⁴¹ A20 es una proteína que obstruye la ubiquitinación de TRAF6 y, por tanto, la transducción de señales río abajo. La conducción de estos mecanismos de impedimento de señalización de TLRs a distintos niveles sugiere la existencia de un fenómeno de tolerancia en circunstancias específicas, y pudieran explicar la regulación de procesos inflamatorios en enfermedades crónicas.

TLRs y hematopoyesis

La hematopoyesis es el proceso por el cual se generan las células sanguíneas a partir de células troncales hematopoyéticas (HSCs) que residen en la médula ósea, las cuales se caracterizan por su capacidad de autorrenovación y multipotencialidad.¹ La diferenciación continua de las HSCs está estrictamente regulada y es crucial para la producción y reabastecimiento de progenitores, precursores y células maduras hematopoyéticas a lo largo de la vida. De acuerdo con su origen las células sanguíneas se clasifican en dos linajes o estirpes: linfoide y mieloide. El linaje linfoide consiste de células B, células T, células asesinas naturales (NK) y algunas categorías de células dendríticas (DC); mientras que el linaje mieloide incluye a los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), monocitos, macrófagos, eritrocitos, megacariocitos, células cebadas y

otras categorías de DC. El progreso de las vías linfoide o mieloide es el resultado de la combinación de factores intrínsecos y microambientales que impulsan la pérdida gradual de opciones de diferenciación en los progenitores, en paralelo con la adquisición de funciones especializadas.²¹

En el ratón, los progenitores linfoides tempranos (ELP), caracterizados por la expresión de la recombinasa RAG1, constituyen el inicio del programa de diferenciación linfoide.⁴² El ELP es productor de células dendríticas plasmacitoides (pDC),⁴³ de células dendríticas asesinas productoras de interferon (IKDCs)⁴² y de progenitores linfoides comunes (CLP), con capacidad de reconstituir los linajes de células T, B y NK.⁴⁴ La transición de los CLPs a células precursoras de B y NK se lleva a cabo en la médula ósea,⁴⁵ pero la diferenciación del linaje T es dependiente de la exportación de progenitores al timo. Por otro lado, la producción de células de estirpe mieloide tiene su origen en los progenitores mieloides comunes,⁴⁶ en tanto las células dendríticas parecen tener un programa único y derivar de las rutas de diferenciación tanto linfoide como mieloide.⁴² Dentro de los factores intrínsecos que regulan la toma de decisiones de linaje se encuentran los factores de transcripción, los reguladores de ciclo celular, la actividad de la telomerasa y el RNA de interferencia;²⁶ mientras que los factores extrínsecos que participan en el proceso incluyen citocinas, quimiocinas, interacciones célula-célula e interacciones a través de la matriz extracelular. Cualquier defecto en su control puede llevar a un estado patológico. De especial importancia es el reciente hallazgo de la participación de los TLRs en la regulación de la hematopoyesis temprana de los vertebrados. Nagai, *et al.* reportaron que los TLRs 2 y 4 se expresan desde los estadios más primitivos de la diferenciación hematopoyética murina y que al ser estimulados con sus ligandos Pam3CSK4 y LPS, respectivamente, inducen a las células troncales y progenitores mieloides a entrar a ciclo celular y promueven su diferenciación a granulocitos y macrófagos, obviando los requerimientos de factores de crecimiento y diferenciación. Semejante estimulación en progenitores linfoides comunes promueve la producción de células dendríticas³¹ (Figura 3), sugiriendo por primera vez que desde las etapas más primitivas de la hematopoyesis se pueden reconocer componentes microbianos y promover o modificar los patrones normales de diferenciación hacia el linaje celular necesario para el combate de patógenos. Hallazgos ulteriores han demostrado que tanto los ligandos sintéticos de TLR9 como la infección aguda por el virus de herpes

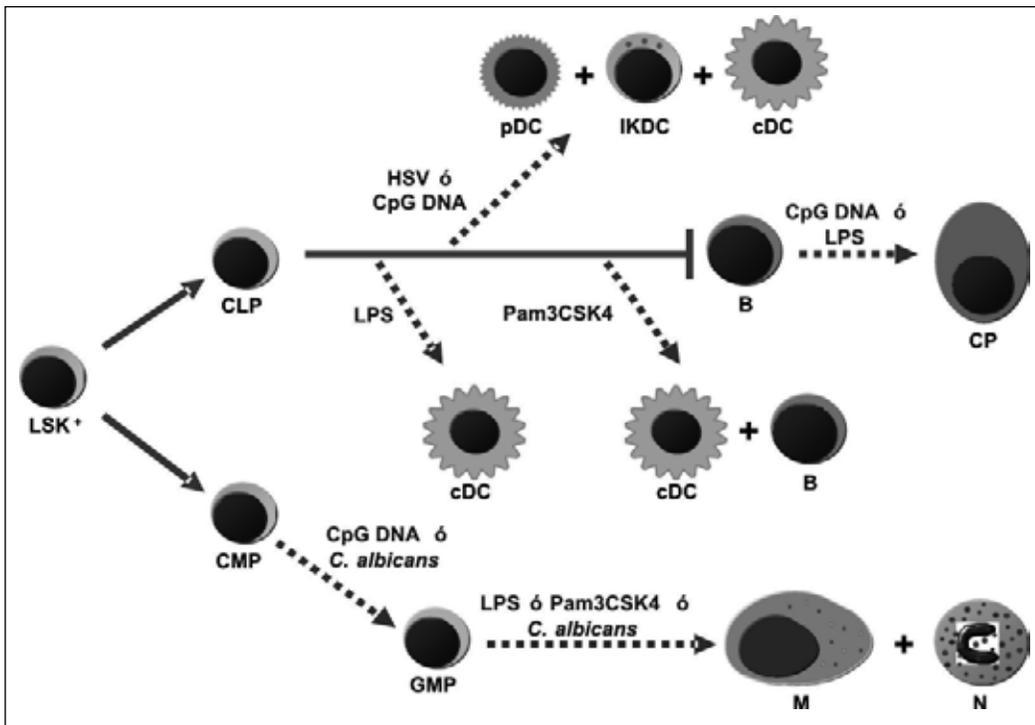


Figura 3. Modificación de los patrones normales de diferenciación hematopoyética de ratón por TLRs. En la hematopoyesis murina, la fracción celular LSK (*Lin⁻Sca1⁺c-kit⁺*) da origen al progenitor linfóide común (CLP) y al progenitor mieloide común (CMP), principales productores de células B y mieloides, respectivamente. La interacción de CLPs con virus del herpes simple o CpG DNA (ligando del TLR9) promueve la diferenciación de células del sistema inmune innato, incluyendo células plasmacitoides dendríticas (pDC), células dendríticas citotóxicas productoras de interferón (IKDC) y células dendríticas convencionales (cDC), a expensas de la linfopoyesis de

B, mientras que la estimulación del TLR2 o TLR4 con Pam3CSK4 o LPS, favorece la producción de cDCs. Las células B estimuladas con CpG DNA o LPS se diferencian a células plasmáticas (CPs). Por otro lado, los CMPs y los progenitores de granulocitos y monocitos (GMPs) que son estimulados con diversos ligandos de TLRs, robustecen la diferenciación de monocitos/macrófagos y neutrófilos. Las flechas continuas representan la vía normal de diferenciación hematopoyética, en tanto la línea trunada significa bloqueo de dicha diferenciación normal. Las flechas punteadas simbolizan la redirección de la diferenciación como resultado de la señalización de los TLRs.

simple (HSV-1) causan el abatimiento de la producción de linfocitos B murinos al tiempo que promueve la diferenciación de células dendríticas convencionales (cDCs), IKDCs y pDCs a partir de progenitores comprometidos de células B, los CLPs⁴⁷ (Figura 3). En soporte a estas observaciones, la interacción de ligandos de TLR4 y TLR9 con células en proceso de diferenciación provenientes de médula ósea promovió la producción de pDCs dependiente de MyD88, mientras que el reconocimiento del virus de influenza y ligandos de TLR3 indujo señales por vías alternas que no resultaron en la generación de células dendríticas,⁴⁸ sugiriendo una posible conexión de la vía de MyD88 y el desarrollo emergente de ciertas poblaciones de la respuesta innata. Recientemente, también se corroboró la adquisición paulatina de transcritos de los TLRs 2, 4 y 9 en paralelo con la diferenciación hematopoyética.⁴⁹ Además, en respuesta a agentes mieloablativos e inflamación, la liberación de citocinas pro-inflamatorias y supresoras provenientes de células del sistema inmune innato y componentes del microambiente de la médula ósea puede alterar los patrones normales de producción

celular, a menudo suprimiendo la linfopoyesis e incrementando la mielopoyesis,^{50,51} así como la exportación prematura de precusores linfoides y mieloides a la periferia.

Por otro lado, el reconocimiento por TLRs en células hematopoyéticas primitivas se extiende a levaduras e hifas de *Candida albicans*, dando como resultado la producción de neutrófilos, macrófagos^{52,53} y células dendríticas⁵⁴ (Figura 3). Los ratones deficientes de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y de factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) desarrollan neutrofilia tanto en médula ósea como en sangre periférica cuando son retados con *Candida albicans*, sugiriendo la diferenciación de células mieloides por efecto de este microorganismo.⁵⁵

En la linfopoyesis de células T se acepta que el timo es colonizado por progenitores hematopoyéticos exportados a través de sangre periférica en un mecanismo dependiente de CCR7 y CCR9.^{56,57} Ratones timectomizados e infectados por *Pneumocystis* mostraron el aumento de HSC y precusores tímicos CCR9⁺ en médula ósea y sangre periférica, de una

manera presumiblemente dependiente de TLR2, TLR4 y TLR9.⁵⁸

También las células troncales embrionarias (CTEs) expresan TLRs y al ser estimuladas con LPS se inducen a proliferar y diferenciarse a linaje mieloide. No obstante este hallazgo, la función de los TLRs en dichas etapas del desarrollo sigue siendo una pregunta abierta.⁵⁹

Río abajo en la diferenciación hematopoyética, las células maduras también muestran perfiles de expresión a menudo relacionados a propiedades funcionales. En el ratón, a diferencia del humano, el TLR4 se expresa en los linfocitos B.⁶⁰ Los linfocitos B vírgenes expresan además los TLRs 2, 7 y 9, y al estimularlos se diferencian a células plasmáticas, mientras que los linfocitos B de memoria pueden diferenciarse *in vitro* a células plasmáticas por la estimulación de TLR7 y 9.⁶¹ Cuando los linfocitos B son estimulados con partículas tipo virus acopladas a ssRNA o CpG DNA pueden sufrir cambio de clase y diferenciarse a células plasmáticas productoras de IgG2a, un fenómeno mediado por la expresión de TLRs e independiente de IFN.⁶²⁻⁶⁴ Las células B también pueden ser inducidas a madurar a través de la estimulación vía TLR4.⁶⁵ Por otro lado, en los linfocitos T la señal simultánea del TCR y los TLRs 2, 5, 7 u 8 promueve la proliferación y producción de citocinas, en tanto que TLR3 y 9 aumentan su sobrevivencia por mecanismos asociados a la activación de NF- κ B y la regulación positiva de la proteína anti-apoptótica Bcl-X1.^{66,67} La población de linfocitos T reguladores con fenotipo CD25⁺CD4⁺ (Treg) también son vulnerables al estímulo de TLR2, TLR5 y TLR8, resultando en la proliferación y la pérdida parcial del fenotipo de Treg *in vitro*.⁶⁸⁻⁷⁰ Sin embargo, dichos hallazgos han sido retados recientemente en un estudio que indica que la estimulación con Pam3CSK4 no modifica la función supresora o la expresión de FoxP3, pero induce la expresión de Bcl-XL, aumentando la sobrevivencia celular. Por otro lado, los precursores de células dendríticas también expresan transcritos de los TLR2, 4 y 9, y cuando los mismos son estimulados desregulan CXCR4, induciendo la migración de la MO hacia órganos linfoides secundarios.⁴⁹ Estos antecedentes abren la posibilidad del uso de ligandos de TLRs como blancos terapéuticos en la modulación de las células Treg en algunas enfermedades autoinmunes.⁷¹

Regulación del sistema hematopoyético en humanos por TLRs

Aunque por razones éticas el conocimiento actual de la hematopoyesis en humanos es relativamente li-

mitado en comparación con el adquirido en los modelos animales, los últimos años han sido testigos del progreso en la identificación de poblaciones celulares y la elucidación de las bases moleculares que regulan su diferenciación. El antígeno CD34 ha resultado el principal marcador para las HSC y los progenitores multi y oligopotenciales. La aparición de la molécula CD10 en las células humanas CD34⁺ que no expresan en la superficie membranal ningún marcador de células sanguíneas maduras, es uno de los eventos que distinguen a los progenitores linfoides. Los progenitores multi-linfoides (MLP), recientemente identificados por John Dick en la Universidad de Toronto, muestran un fenotipo muy inmaduro y dan lugar a todos los tipos celulares linfoides (T, B y NK), además de macrófagos y DC,⁷² mientras que el progenitor mieloide común (CMP) es responsable de la producción mieloide.⁷³

La infección causada por el virus herpes humano 7 (HHSV-7) en células CD34⁺ de sangre de cordón umbilical (SCU) promueve la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos hacia linaje mieloide, con la pérdida gradual del antígeno CD34 y la consecuente ganancia de CD33, CD14 y CD15.⁷⁴ Por otro lado, la producción de IL-8 como resultado de la estimulación del TLR9 en estadios primitivos de la diferenciación,⁷⁵ y la expresión de transcritos de TLR4, TLR7, TLR8, MyD88 e IRAK1 en células CD34⁺ de médula ósea, sugieren la existencia de vías de señalización funcionales que responden al R848 (ligando agonista de TLR7/8) y a RNAs de interferencia, induciendo la diferenciación hacia monocitos, macrófagos y células dendríticas⁷⁶ (Figura 4). En soporte, la estimulación de células CD34⁺ de médula ósea con loxoribina y Pam₃CSK₄ (ligandos agonistas de TLR7 y TLR2, respectivamente) es capaz de producir factores como IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, G-CSF, TNF α , IL-1 β , MCP-1, MIP1 α y MIP-1 β , IL-1R α e IP-10, que en conjunto pueden regular positiva o negativamente la diferenciación hacia el linaje mieloide con producción de monocitos y células dendríticas, así como la sobrevivencia celular (Figura 4). En estos estudios la diferenciación de células CD34⁺ hacia células dendríticas mieloides (mDCs) aparentemente es dependiente de la estimulación autocrina de TNF α .⁷⁷ Por otro lado, De Luca, *et al.* describieron que las HSCs y progenitores tienen patrones de expresión únicos, con niveles comparables de transcritos de TLRs 1 y 6; mayor expresión de transcritos codificantes para el TLR3 en HSCs, y poca o nula expresión de los transcritos de TLR2, 4, 7, 8, 9 y 10. Las células Lin⁻CD34⁺ provenientes de sangre de cordón umbilical al contacto con R848, LPS, Poly

I:C, CpG DNA y Pam3CSK4 inhiben la producción de células linfoides B, mientras que la diferenciación mieloide se mantiene o promueve *in vitro*. Por el contrario, la estimulación con flagelina no altera la producción de células B pero aumenta discretamente la producción de células mieloides. Un incremento en la producción de células con fenotipo megacariocitoide (CD41a⁺) también se ha observado tras el tratamiento de HSCs con Pam3CSK4.⁷⁸ No obstante, se ha sugerido la posible inducción de apoptosis por TLRs, aunque aún es discutible su actividad independiente de otras señales.⁷⁹ En conjunto, estos hallazgos sugieren que los fenómenos descritos en el sistema hematopoyético de ratón pueden ser extrapolados al humano, y que las células seminales son vulnerables a señales microbianas extrínsecas, a las que responden con la producción de células de la respuesta inmune innata. En concordancia, nuestros hallazgos muestran que los progenitores linfoides multipotenciales provenientes de médula ósea, sangre de cordón umbilical y sangre periférica movilizada expresan TLR9 funcional y contribuyen sustancialmente a la diferenciación de células NK y dendríticas como resultado de su en-

cuentro con componentes de herpes virus tipo 1 (Vadillo, próxima aparición). Queda por determinar si la estabilidad del linaje es perturbada por tiempos prolongados bajo estas circunstancias, y si ello representa una amenaza para la reconstitución del sistema inmune, o por el contrario, una vía para robustecer periódicamente la linfohematopoyesis temprana.

En humanos, a diferencia del ratón, las células B en formación exhiben niveles bajos o nulos de transcritos de TLRs, pero los linfocitos B de memoria muestran preferentemente transcritos de TLRs 6, 7, 9 y 10 y se diferencian a células plasmáticas productoras de IgG en respuesta a CpG, mientras que las células B vírgenes sólo lo hacen si son activadas de manera simultánea con el BCR⁸⁰ (Figura 3). De manera interesante, además de la producción de citocinas proinflamatorias, la estimulación de linfocitos B con ligandos de TLR2 puede promover la producción de factores de crecimiento mieloides (GM-CSF y G-CSF).⁸¹ Por su parte, los TLRs 1, 2, 3, 5, 7 y 9 en los linfocitos T actúan como coestimuladores para la proliferación y producción de citocinas cuando éstos son activados vía TCR.^{82,83}

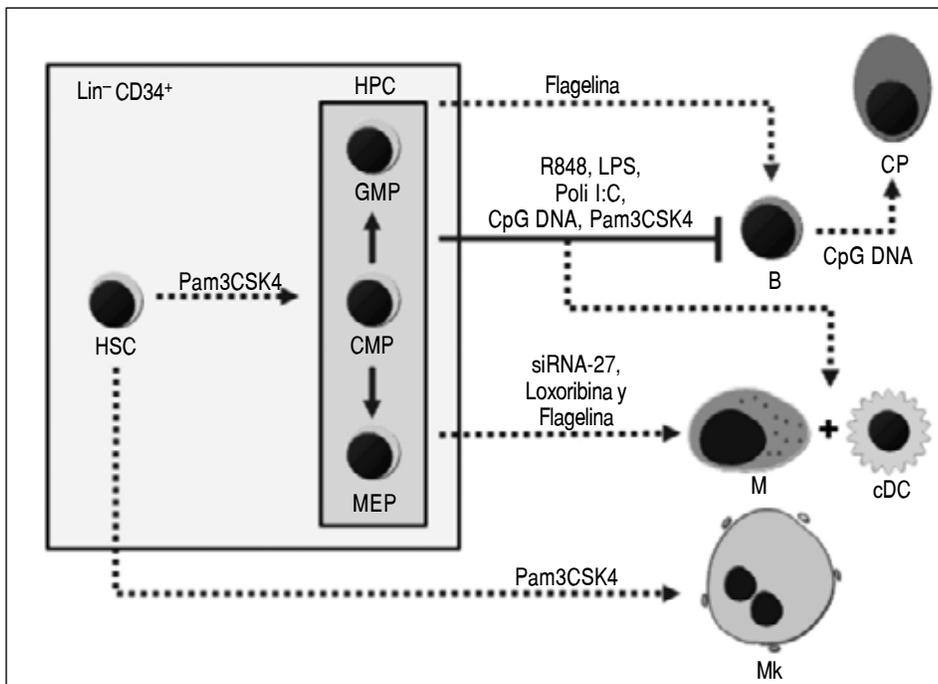


Figura 4. La estimulación de los TLRs modula la hematopoyesis humana. Las células troncales hematopoyéticas (HSC) dan origen a progenitores mieloides comunes (CMP) y éstos producen progenitores de granulocitos y monocitos (GMP), y progenitores de megacariocitos y eritrocitos (MEP). Todas estas poblaciones celulares primitivas dentro del compartimiento Lin⁻

CD34⁺ son vulnerables a la señalización por TLRs y responden con cambios en las decisiones de linaje. La interacción con Pam3CSK4 bloquea la producción de células B y promueve la megacariocitopoyesis y la producción de progenitores mieloides. Por otro lado, la diferenciación hacia monocitos y células dendríticas es estimulada por R848, LPS, Poli I:C, CpG DNA, Pam3CSK4, siRNA-27, Loxoribina y flagelina. La flagelina es el único ligando de TLR reportado como promotor de la producción de células B, mismas que cuando se estimulan con CpG DNA se diferencian a células plasmáticas (CP). Las flechas continuas representan la vía normal de diferenciación hematopoyética, en tanto la línea truncada significa bloqueo de dicha diferenciación normal. Las flechas punteadas simbolizan la redirección de la diferenciación como resultado de la señalización de los TLRs.

TLRs en patologías hematológicas

Recientemente, la alta expresión de TLRs en algunos tipos de cáncer ha sido correlacionada con la progresión de la enfermedad. En estas patologías, la estimulación de los TLRs parece inducir el crecimiento tumoral, la evasión de la respuesta inmune y la resistencia a apoptosis y a fármacos, señalando a los TLRs como potenciales blancos en la terapéutica del cáncer,⁸⁴ ya sea a través de estrategias de bloqueo de la unión de sus ligandos a los LRRs, de la obstrucción de la dimerización de receptores y del arresto de moléculas de señalización o, al contrario, en la inmunoestimulación con adyuvantes.⁸⁵

En la leucemia linfocítica crónica (LLC), que es la forma más común de leucemia en adultos, causada por la acumulación de células B CD5⁺ en órganos linfoides,⁸⁶ las células leucémicas muestran poca inmunogenicidad. En ellas, la expresión de transcritos de TLR7 y TLR9 son constantes^{77,78} y cuando son estimuladas con agonistas del TLR9 (DNA CpG) son inducidas a proliferar e incrementar la expresión de sus moléculas MHC-I, de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, y de moléculas de adhesión como CD54 y CD58, así como de CD40,⁸⁷ de tal manera que se tornan visibles por las células de vigilancia inmunológica. Un efecto similar se observa cuando la LLC es tratada con ligandos de TLR7 como la imidazoquinolina y el S28690, que además inducen la expresión de CD83 y la producción de TNF α e IL6.⁸⁸ Adicionalmente se ha reportado que los motivos CpG inducen apoptosis en células de LLC,⁸⁹ haciendo promisorio su utilidad en la inducción de la sensibilidad celular a la quimioterapia. Hasta ahora, el uso de agonistas de TLRs en LLC se encuentra en la fase I de investigación clínica.⁹⁰ Por otro lado, en la leucemia mieloide aguda (LMA) caracterizada por la proliferación de precursores mieloides, se ha considerado la factibilidad de una vacuna utilizando LPS o CpG DNA para la inducción de respuestas tipo Th1. Aunque los patrones de expresión de TLRs son aparentemente similares entre las DCs de donadores sanos y pacientes leucémicos, las DCs leucémicas producen más TNF α e IL6.⁹¹ En otros estudios la administración de un agonista de TLR7/8 a células de LMA indujo también el aumento de MHC-I, la producción de citocinas inflamatorias y la capacidad estimuladora de células T vírgenes alogénicas. El cocultivo de las células de LMA con células mononucleares de sangre periférica alogénicas en presencia de R-848 resultó en la dramática producción de IFN γ por células NK y NKT que culminó con la muerte de células leucémicas.⁹²

La alta expresión de TLRs y la producción de mediadores inflamatorios como consecuencia de su señalización también se han relacionado con la patogénesis de enfermedades autoinmunes, infecciosas e inflamatorias crónicas. Aunque el mecanismo preciso que opera en las enfermedades autoinmunes no está claro, éstas se caracterizan por la destrucción masiva de tejidos y la posible liberación local o sistémica de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), potencialmente reconocidos por TLRs. En la artritis reumatoide el infiltrado masivo de células de la respuesta inmune innata productoras de metaloproteasas presumiblemente contribuyen al desarrollo de la enfermedad y a la generación de ligandos de TLRs endógenos como fibronectina, biglicanos, fibrinógeno, tenacina-C y el ácido hialurónico, entre otros.⁴ Adicionalmente, las DC localizadas en los sitios de daño expresan abundantemente los TLRs 2, 3, 5, 6 y 9,⁹³ y producen a tasas altas TNF α e IL6 cuando son estimuladas con ligandos de TLR2 y TLR4, sugiriendo su contribución a un círculo inflamatorio.⁹⁴

Las señales de los TLRs participan también en la elevada producción de TNF α , IL6 e IL1 β durante cuadros de sepsis caracterizados por respuestas hiperinflamatorias por infección bacteriana. En este escenario los macrófagos activados son capaces de producir HMGB1 como ligando de TLR2 y contribuir al estado inflamatorio.^{95,96} Un número de moléculas participan en ello, además de HMGB1: fibrinógeno, la elastasa del neutrófilo y algunas histonas recientemente identificadas como ligandos de TLR2 y TLR4, que son posibles causantes de daño renal y hepático.⁹⁷ Por otro lado, el proceso inflamatorio producido por la acumulación de lípidos modificados en las paredes arteriales en la aterosclerosis implica el reclutamiento de monocitos que reconocen lipoproteínas de baja densidad (LDL) y proteínas de choque térmico a través de TLR4.⁹⁸

Por último, en ciertos tipos de cáncer, la estimulación de los TLRs puede promover la proliferación y sobrevida celulares. Los modelos de cáncer gástrico han sugerido la participación de la estimulación crónica de TLR2 por *L. monocytogenes* y *H. pylori* en el proceso carcinogénico.⁹⁹ Asimismo, en mieloma múltiple las células plasmáticas expresan aberrantemente TLRs y su estimulación promueve la proliferación y sobrevida de manera dependiente de IL6 autócrina.^{91,100,101} En otros tipos de cáncer se ha propuesto la estimulación crónica de TLR4 por ligandos endógenos (Cuadro 1) como promotora de progresión neoplásica. Tal es el caso del cáncer pulmonar y el de mama, asociados a la actividad

de heparan sulfato, el osteosarcoma asociado a fibrinógeno, y el linfoma y cáncer de ovario asociados a la tenacin-C.

Uso de agonistas y antagonistas de TLRs en la terapéutica

Los TLRs y sus ligandos se han convertido en blanco de estudios terapéuticos para su uso potencial en enfermedades infecciosas, alérgicas y cáncer. El primer agonista aprobado por la FDA fue el bacilo Calmette-Guerin (BCG) que en la actualidad está disponible con el nombre de TICE y PACIS, de los laboratorios Organon y Biochem Vaccines, respectivamente. Por su actividad agonista de TLR2, TLR4 y TLR9 y efecto pro-inflamatorio y mediador de inmunidad mediada por células T, se utiliza en el tratamiento del cáncer de vejiga.¹⁰² Varios agonistas de TLRs se encuentran en fase de investigación y han mostrado ser buenos candidatos para la modulación de la respuesta inmune. Posiblemente el mayor progreso se registró en el área de la vacunación, en donde son utilizados como adyuvantes; algunas de las vacunas que los incluyen ya están disponibles para uso comercial (Cuadro 2). El lípido A monofosforilado (MPLA) se ha incorporado exitosamente como adyuvante en la vacuna de la hepatitis B (Fendrix y Supervax) y en la del virus de papiloma humano VPH (Cervarix), mientras que hoy día se encuentra en fase clínica de investigación para su uso en vacunas contra cáncer de pulmón y melanoma.^{103,104} Asimismo, el uso de éste u otros ligandos agonistas, incluyendo los de TLR9, en vacunas como las de influenza y de la inmunodeficiencia humana, aún es cuestionable.¹⁰³ En las enfermedades alérgicas uno de los principales objetivos de la terapia con agonistas de TLR4 y TLR9 es equilibrar la respuesta tipo Th2 establecida por la inapropiada reactividad a antígenos inocuos presentes en el medio ambiente. Así, la inhibición de la

producción de citocinas como la IL4, IL5 e IL10 que promueven la producción de IgE y la localización de los eosinófilos en la rinitis alérgica y el asma auxiliaría en la recuperación de la homeostasis.¹⁰⁴ Disponible en el mercado, Pollinex Quattro se utiliza en el tratamiento de los síntomas alérgicos causados por el polen de *Ambrosia spp.*, y fue desarrollado por la modificación con glutaraldehído de un extracto de polen unido a una L-tirosina y al lípido A monofosforilado (MPLA). Este adyuvante agonista del TLR4 es mil veces menos tóxico que el LPS y capaz de inducir eficientemente la producción de citocinas tipo Th1.¹⁰⁵ Por otro lado, tres agonistas de TLR9 (DNA CpG A, B y C) han mostrado promover la producción de diferentes patrones de citocinas provenientes de distintas poblaciones celulares: el CpG A y C inducen la producción de IFN α por células B y pDCs, en tanto que el CpG B induce la maduración de las cDCs pero la pobre producción de IFN α . Como resultado, estos agentes inhiben la producción de citocinas tipo Th2 y son potencialmente efectivos para el tratamiento de las respuestas crónicas características de los pacientes asmáticos que cursan con inflamación de vías respiratorias a consecuencia de la repetida exposición a alérgenos y la constante presentación antigénica por las DCs.^{103,106}

En el caso de las enfermedades infecciosas, particularmente de tipo viral, los agonistas de los TLRs intracelulares (TLR3, 7, 8 y 9) se han propuesto como candidatos, cuya funcionalidad se debe a la inducción de la producción de interferones tipo I y la estimulación de citotoxicidad en las células NK, así como la conducción de respuestas dependientes de células T. Su uso en la clínica continúa bajo intensa investigación.

En la terapia contra el cáncer los agonistas de TLRs promueven la inmunidad innata y adaptativa, e inducen apoptosis en los tumores que expresan sus receptores. El Imiquimod (Aldara) (Cuadro 2)

Cuadro 2. Agonistas de TLRs utilizados actualmente en la clínica.

Nombre comercial	Receptor blanco	Compañía	Uso terapéutico
Tice y Pacis	TLR2 TLR4 TLR9	Organon y BioChem Vaccines	Cáncer de vejiga
Pollinex Quattro	TLR4	Allergy Therapeutics	Rinitis alérgica
Fendrix		Glaxo SmithKline	Hepatitis B
Supervax		Dynavax Technologies	
Cervarix		Glaxo SmithKline	Papiloma humano
Aldara	TLR7	3M Pharma	Carcinoma de células basales Verrugas genitales por VPH

es un agonista del TLR7 que induce la producción de IFN tipo I, el cual tiene actividad antitumoral y antiviral, por lo que se le utiliza en la terapéutica del carcinoma de células basales y en el tratamiento contra las verrugas genitales causadas por el VPH, condilomas y la queratosis actínica.¹⁰² Aunque los agonistas de TLRs ofrecen potenciales beneficios en las enfermedades neoplásicas, están situados como complementos en el esquema terapéutico concomitante con radioterapia, fármacos citotóxicos y/o anticuerpos monoclonales.^{104,107}

Además de los ligandos disponibles comercialmente, existen agonistas del TLR7, TLR3 y TLR9 que se encuentran en ensayos clínicos para su posible uso. Resiquimod induce la producción de TNF e IL12 y suprime la función de las células T reguladoras,¹⁰⁸ mientras que el CpG se encuentra en ensayos clínicos para carcinoma de células basales y melanoma, promoviendo la inflamación local y sistémica con resultados alentadores.¹⁰⁹

A la par del estudio de los agonistas de TLRs como agentes coterapéuticos, se han desarrollado moléculas antagonistas que se unen al receptor pero que no pueden inducir señales y previenen la acción agonista de algunos ligandos responsables del fenómeno inflamatorio agudo en enfermedades infecciosas y autoinmunes que en ocasiones llevan al paciente a la sepsis, a la falla multiorgánica o a la muerte.^{107,110} El control de algunas enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoide quizá es otro punto en donde la aplicación de antagonistas sería deseable. Hasta ahora, no existen medicamentos que contengan estos agentes; sin embargo, existen algunos análogos del lípido A que funcionan como agonistas y antagonistas del TLR4. Tal es el caso de Eritoran, análogo del lípido A que se une a la proteína MD2, y se encuentra en la fase III de investigación para el tratamiento del choque séptico. Además, el antagonista del TLR4 Ibudilast (AV411) se encuentra en fase II de ensayos clínicos para el tratamiento del dolor.¹⁰⁸ El TLR2 puede ser antagonizado con el anticuerpo T2.5 y ha probado inhibir sepsis inducida por los ligandos de TLR2. Cuando este anticuerpo es utilizado junto con un anticuerpo anti-TLR4/MD2 se evita la sepsis provocada por *Salmonella* y *E. coli* cuando se administran a la par con antibióticos.¹¹¹ Algunas otras como el IMO-3100 y DV1179, variantes de CpG DNA, han sido diseñadas para el bloqueo simultáneo del TLR7 y TLR9 y se encuentran en fase I de ensayos clínicos con la posibilidad de que los pacientes que son tratados con esteroides pue-

dan reducir su administración y con ello disminuir sus efectos secundarios. Los ensayos preclínicos han demostrado que este agente puede bloquear la producción de IFN y reducir los síntomas de enfermedades autoinmunes.¹⁰⁴ Otros como PF-3512676, agonista del TLR9, han sido incorporados a ensayos clínicos en fase II pero sin resultados muy alentadores.¹⁰⁸ Finalmente, el CpG-52364 se encuentra en fase I por su probada efectividad en la prevención de la producción de anticuerpos anti-DNA en LES en ratones.¹⁰⁸

CONCLUSIONES

El aprendizaje de los mecanismos de la inmunidad innata ha progresado notablemente a partir del descubrimiento de los receptores que reconocen patrones, entre ellos destacan los TLRs, que no solamente participan en la secreción de citocinas proinflamatorias y la expresión de moléculas coestimuladoras implicadas en la modulación de la respuesta inmune, sino también en el control de los eventos más tempranos de la hematopoyesis. La definición de los mecanismos moleculares que utilizan estos receptores para ejercer sus funciones ha revolucionado el entendimiento de la regulación del sistema hematopoyético y otros sistemas en el organismo, y nos permite concebir el tratamiento de enfermedades infecciosas, autoinmunes y neoplásicas desde una perspectiva más integral, en la cual, paralelo a la estimulación inmediata de poblaciones efectoras, se promueve el reabastecimiento de células emergentes de la respuesta inmune innata.

AGRADECIMIENTOS

Las investigaciones en el Laboratorio de Linfopoyesis de la UIMEO son financiadas por la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). E.V. es becario CONACyT para estudios de Doctorado.

ABREVIATURAS

- CLP: progenitor linfoide común (*common lymphoid progenitor*).
- CMP: progenitor mieloide común (*common myeloid progenitor*).
- DAMPS: patrones moleculares asociados a daño (*damage-associated molecular patterns*).
- ELP: progenitor linfoide temprano (*early lymphoid progenitor*).

- HSC: célula troncal hematopoyética (*hematopoietic stem cell*).
 - IKK: inhibidor del complejo NF-κB/IκB [*inhibitor of nuclear factor κB (IκB)-kinase complex*].
 - IRAK: cinasa asociada al receptor de IL1 (*IL-1-receptor associated kinase*).
 - IκB: inhibidor de NF-κB (*inhibitor of NF-κB*).
 - LBP: proteína de unión a lipopolisacárido (*LPS-binding protein*).
 - LRRs: regiones ricas en leucina (*leucine-rich repeats*).
 - MAPK: proteína cinasa activada por mitógenos (*mitogen-activated protein kinase*).
 - MEP: progenitor de megacariocitos y eritrocitos (*megakaryocyte-erythroid progenitor*).
 - MLP: progenitor multi-linfoide (*multi-lymphoid progenitor*).
 - MyD88: proteína de respuesta primaria a la diferenciación mieloide 88 (*myeloid differentiation primary-response protein 88*).
 - NEMO: modulador esencial de NF-κB (*NF-κB essential modulator*).
 - PAMPS: patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen associated molecular patterns*).
 - PRRs: receptores que reconocen patrones (*pattern recognition receptors*).
 - TAB: proteína que se une a TAK-1 (*TAK-binding protein*).
 - TAK: cinasa activada por el factor de crecimiento transformante β (*transforming growth factor-β-activated kinase*).
 - TBK1: miembro de la familia TRAF asociado a la cinasa de unión para la activación de NF-κB (*TRAF-family-member associated NF-κB activator (TANK)-binding kinase 1*).
 - TIR: dominio Toll/receptor de IL1 (*Toll/interleukin-1-receptor*).
 - TIRAP: proteína adaptadora asociada al dominio TIR (*TIR-domain-containing adaptor protein*).
 - TRADD: proteína con dominio de muerte asociada al receptor de TNF (*TNF-receptor associated via death domain*).
 - TRAF6: factor 6 asociado al receptor de TNF (*TNF-receptor associated factor 6*).
 - TRAM: molécula adaptadora asociada a TRIF (*TRIF-related adaptor molecule*).
 - TRIF: dominio TIR que contiene a la proteína adaptadora que induce IFN (*TIR-domain-containing adaptor molecule*).
 - Ubc13: enzima 13 que conjuga ubiquitina (*ubiquitin-conjugating enzyme 13*).
 - Uev1A: enzima E2 variante 1 que conjuga ubiquitina (*ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1*).
1. Mayani H. A glance into somatic stem cell biology: basic principles, new concepts, and clinical relevance. *Arch Med Res* 2003; 34: 3-15.
 2. Marsh JC, Boggs DR, Cartwright GE, et al. Neutrophil kinetics in acute infection. *J Clin Invest* 1967; 46: 1943-53.
 3. Anderson KV, Jurgens G, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 1985; 42: 779-89.
 4. Piccinini AM, Midwood KS. DAMPenning inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm* 2010.
 5. Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 2006; 442: 39-44.
 6. Lee MS, Kim YJ. Pattern-recognition receptor signaling initiated from extracellular, membrane, and cytoplasmic space. *Mol Cells* 2007; 23: 1-10.
 7. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801.
 8. Levashina EA, Langley E, Green C, et al. Constitutive activation of toll-mediated antifungal defense in serpin-deficient Drosophila. *Science* 1999; 285: 1917-9.
 9. 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.
 10. McGettrick AF, O'Neill LA. Toll-like receptors: key activators of leucocytes and regulator of haematopoiesis. *Br J Haematol* 2007; 139: 185-93.
 11. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* 1996; 86: 973-83.
 12. Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282: 2085-8.
 13. Travis J. Nobel Prize in physiology or medicine. Immunology prize overshadowed by untimely death of awardee. *Science* 2011; 334: 31.
 14. Blasius AL, Beutler B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity* 2010; 32: 305-15.
 15. Gilliet M, Cao W, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 594-606.
 16. Arancibia SA, Beltran CJ, Aguirre IM, et al. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol Res* 2007; 40: 97-112.
 17. Schaefer L, Babelova A, Kiss E, et al. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest* 2005; 115: 2223-33.
 18. Midwood K, Sacre S, Piccinini AM, et al. Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nat Med* 2009; 15: 774-80.
 19. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; 11: 373-84.
 20. Funderburg N, Lederman MM, Feng Z, et al. Human-defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 18631-5.
 21. Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Toll-like receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 57-63.
 22. Smith KD, Andersen-Nissen E, Hayashi F, et al. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for

- protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol* 2003; 4: 1247-53.
23. Andersen-Nissen E, Smith KD, Strobe KL, et al. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 9247-52.
 24. Kariko K, Ni H, Capodici J, et al. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem* 2004; 279: 12542-50.
 25. Mancuso G, Gambuzza M, Midiri A, et al. Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nat Immunol* 2009; 10: 587-94.
 26. Baltimore D, Boldin MP, O'Connell RM, et al. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol* 2008; 9: 839-45.
 27. Wagner H. Hemozoin: malaria's «built-in» adjuvant and TLR9 agonist. *Cell Host Microbe* 2010; 7: 5-6.
 28. Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, et al. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 2002; 416: 603-7.
 29. Hasan U, Chaffois C, Gaillard C, et al. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol* 2005; 174: 2942-50.
 30. Nyman T, Stenmark P, Flodin S, et al. The crystal structure of the human toll-like receptor 10 cytoplasmic domain reveals a putative signaling dimer. *J Biol Chem* 2008; 283: 11861-5.
 31. Nagai Y, Garrett KP, Ohta S, et al. Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity* 2006; 24: 801-12.
 32. Park BS, Song DH, Kim HM, et al. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 2009; 458: 1191-5.
 33. Lord KA, Abdollahi A, Hoffman-Liebermann B, et al. Dissection of the immediate early response of myeloid leukemia cells to terminal differentiation and growth inhibitory stimuli. *Cell Growth Differ* 1990; 1: 637-45.
 34. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 2004; 16: 3-9.
 35. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 2011; 34: 637-50.
 36. Adachi O, Kawai T, Takeda K, et al. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 1998; 9: 143-50.
 37. Bhoj VG, Chen ZJ. Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature* 2009; 458: 430-7.
 38. Deng L, Wang C, Spencer E, et al. Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 2000; 103: 351-61.
 39. Hasan UA, Caux C, Perrot I, et al. Cell proliferation and survival induced by Toll-like receptors is antagonized by type I IFNs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 8047-52.
 40. Burns K, Janssens S, Brissoni B, et al. Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *J Exp Med* 2003; 197: 263-8.
 41. Kobayashi K, Hernandez LD, Galan JE, et al. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 2002; 110: 191-202.
 42. Welner RS, Pelayo R, Garrett KP, et al. Interferon-producing killer dendritic cells (IKDCs) arise via a unique differentiation pathway from primitive c-kit^{Hi}CD62L⁺ lymphoid progenitors. *Blood* 2007; 109: 4825-931.
 43. Pelayo R, Hirose J, Huang J, et al. Derivation of 2 categories of plasmacytoid dendritic cells in murine bone marrow. *Blood* 2005; 105: 4407-15.
 44. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 1997; 91: 661-72.
 45. Hardy RR, Kincade PW, Dorshkind K. The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage. *Immunity* 2007; 26: 703-14.
 46. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, et al. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 2000; 404: 193-7.
 47. Welner RS, Pelayo R, Nagai Y, et al. Lymphoid precursors are directed to produce dendritic cells as a result of TLR9 ligation during herpes infection. *Blood* 2008; 112: 3753-61.
 48. Downes JE, Marshall-Clarke S. Innate immune stimuli modulate bone marrow-derived dendritic cell production in vitro by toll-like receptor-dependent and -independent mechanisms. *Immunology* 2010; 131: 513-24.
 49. Schmid MA, Takizawa H, Baumjohann DR, et al. Bone marrow dendritic cell progenitors sense pathogens via Toll-like receptors and subsequently migrate to inflamed lymph nodes. *Blood* 2011; 118: 4829-40.
 50. Baldrige MT, King KY, Goodell MA. Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells. *Trends Immunol* 2011; 32: 57-65.
 51. Esplin BL, Shimazu T, Welner RS, et al. Chronic exposure to a TLR ligand injures hematopoietic stem cells. *J Immunol* 2011; 186: 5367-75.
 52. Yanez A, Flores A, Murciano C, et al. Signalling through TLR2/MyD88 induces differentiation of murine bone marrow stem and progenitor cells to functional phagocytes in response to *Candida albicans*. *Cell Microbiol* 2010; 12: 114-28.
 53. Yanez A, Murciano C, O'Connor JE, et al. *Candida albicans* triggers proliferation and differentiation of hematopoietic stem and progenitor cells by a MyD88-dependent signaling. *Microbes Infect* 2009; 11: 531-5.
 54. Yanez A, Megias J, O'Connor JE, et al. *Candida albicans* Induces Selective Development of Macrophages and Monocyte Derived Dendritic Cells by a TLR2 Dependent Signalling. *PLoS One* 2011; 6: e24761.
 55. Basu S, Hodgson G, Zhang HH, et al. «Emergency» granulopoiesis in G-CSF-deficient mice in response to *Candida albicans* infection. *Blood* 2000; 95: 3725-33.
 56. Schwarz BA, Sambandam A, Maillard I, et al. Selective thymus settling regulated by cytokine and chemokine receptors. *J Immunol* 2007; 178: 2008-17.
 57. Zlotoff DA, Sambandam A, Logan TD, et al. CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus. *Blood* 2010; 115: 1897-905.
 58. Shi X, Zhang P, Sempowski GD, et al. Thymopoietic and bone marrow response to murine *Pneumocystis pneumonia*. *Infect Immun* 2011; 79: 2031-42.
 59. Lee SH, Hong B, Sharabi A, et al. Embryonic stem cells and mammary luminal progenitors directly sense and respond to microbial products. *Stem Cells* 2009; 27: 1604-15.
 60. Chiron D, Bekerredjian-Ding I, Pellat-Deceunynck C, et al. Toll-like receptors: lessons to learn from normal and malignant human B cells. *Blood* 2008; 112: 2205-13.
 61. Richard K, Pierce SK, Song W. The agonists of TLR4 and 9 are sufficient to activate memory B cells to differentiate into plasma cells in vitro but not in vivo. *J Immunol* 2008; 181: 1746-52.
 62. Peng SL. Signaling in B cells via Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2005; 17: 230-6.
 63. Jegerlehner A, Maurer P, Bessa J, et al. TLR9 signaling in B cells determines class switch recombination to IgG2a. *J Immunol* 2007; 178: 2415-20.
 64. Hinton HJ, Jegerlehner A, Bachmann MF. Pattern recognition by B cells: the role of antigen repetitiveness versus Toll-like receptors. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 319: 1-15.

65. Hayashi EA, Akira S, Nobrega A. Role of TLR in B cell development: signaling through TLR4 promotes B cell maturation and is inhibited by TLR2. *J Immunol* 2005; 174: 6639-47.
66. Gelman AE, Zhang J, Choi Y, et al. Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4+ T cell survival. *J Immunol* 2004; 172: 6065-73.
67. Kabelitz D. Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 39-45.
68. Suttmuller RP, den Brok MH, Kramer M, et al. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest* 2006; 116: 485-94.
69. Crellin NK, Garcia RV, Hadisfar O, et al. Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol* 2005; 175: 8051-9.
70. Peng G, Guo Z, Kiniwa Y, et al. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. *Science* 2005; 309: 1380-4.
71. Chen Q, Davidson TS, Huter EN, et al. Engagement of TLR2 does not reverse the suppressor function of mouse regulatory T cells, but promotes their survival. *J Immunol* 2009; 183: 4458-6.
72. Doulatov S, Notta F, Eppert K, et al. Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat Immunol* 2010; 11: 585-93.
73. Seita J, Weissman IL. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2010; 2: 640-53.
74. Mirandola P, Secchiero P, Pierpaoli S, et al. Infection of CD34(+) hematopoietic progenitor cells by human herpesvirus 7 (HHV-7). *Blood* 2000; 96: 126-31.
75. Kim JM, Kim NI, Oh YK, et al. CpG oligodeoxynucleotides induce IL-8 expression in CD34+ cells via mitogen-activated protein kinase-dependent and NF-kappaB-independent pathways. *Int Immunol* 2005; 17: 1525-31.
76. Sioud M, Floisand Y, Forfang L, et al. Signaling through toll-like receptor 7/8 induces the differentiation of human bone marrow CD34+ progenitor cells along the myeloid lineage. *J Mol Biol* 2006; 364: 945-54.
77. Sioud M, Floisand Y. TLR agonists induce the differentiation of human bone marrow CD34+ progenitors into CD11c+ CD80/86+ DC capable of inducing a Th1-type response. *Eur J Immunol* 2007; 37: 2834-46.
78. De Luca K, Frances-Duvert V, Asensio MJ, et al. The TLR1/2 agonist PAM(3)CSK(4) instructs commitment of human hematopoietic stem cells to a myeloid cell fate. *Leukemia* 2009; 23: 2063-74.
79. Liu J, Guo YM, Hirokawa M, et al. A synthetic double-stranded RNA, poly I:C, induces a rapid apoptosis of human CD34(+) cells. *Exp Hematol* 2012; 40: 330-41.
80. Bernasconi NL, Onai N, Lanzavecchia A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* 2003; 101: 4500-04.
81. Agrawal S, Gupta S. TLR1/2, TLR7, and TLR9 signals directly activate human peripheral blood naive and memory B cell subsets to produce cytokines, chemokines, and hematopoietic growth factors. *J Clin Immunol* 2011; 31: 89-98.
82. Caron G, Duluc D, Fremaux I, et al. Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells. *J Immunol* 2005; 175: 1551-7.
83. Komai-Koma M, Jones L, Ogg GS, et al. TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 3029-34.
84. Yu L, Chen S. Toll-like receptors expressed in tumor cells: targets for therapy. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57: 1271-8.
85. Rezaei N. Therapeutic targeting of pattern-recognition receptors. *Int Immunopharmacol* 2006; 6: 863-9.
86. Muzio M, Scielzo C, Bertilaccio MT, et al. Expression and function of toll like receptors in chronic lymphocytic leukemia cells. *Br J Haematol* 2009; 144: 507-16.
87. Uematsu S, Sato S, Yamamoto M, et al. Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- α induction. *J Exp Med* 2005; 201: 915-23.
88. Spaner DE, Shi Y, White D, et al. Immunomodulatory effects of Toll-like receptor-7 activation on chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 2006; 20: 286-95.
89. Jahrsdorfer B, Wooldridge JE, Blackwell SE, et al. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides induce apoptosis of B cell chronic lymphocytic leukemia cells. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 378-87.
90. Spaner DE, Masellis A. Toll-like receptor agonists in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2007; 21: 53-60.
91. Schmitt A, Li L, Giannopoulos K, et al. Quantitative expression of Toll-like receptor-2, -4, and -9 in dendritic cells generated from blasts of patients with acute myeloid leukemia. *Transfusion* 2008; 48: 861-70.
92. Smits EL, Cools N, Lion E, et al. The Toll-like receptor 7/8 agonist resiquimod greatly increases the immunostimulatory capacity of human acute myeloid leukemia cells. *Cancer Immunol Immunother* 2010; 59: 35-46.
93. Tamaki Y, Takakubo Y, Hirayama T, et al. Expression of Toll-like receptors and their signaling pathways in rheumatoid synovitis. *J Rheumatol* 2011; 38: 810-20.
94. Roelofs MF, Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, et al. The expression of toll-like receptors 3 and 7 in rheumatoid arthritis synovium is increased and costimulation of toll-like receptors 3, 4, and 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2313-22.
95. Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290: C917-C924.
96. Xu J, Zhang X, Pelayo R, et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med* 2009; 15: 1318-21.
97. Xu J, Zhang X, Monestier M, et al. Extracellular histones are mediators of death through TLR2 and TLR4 in mouse fatal liver injury. *J Immunol* 2011; 187: 2626-31.
98. Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Pecoraro R, et al. Atherosclerosis as an Inflammatory Disease. *Curr Pharm Des* 2012.
99. Huang B, Zhao J, Shen S, et al. *Listeria monocytogenes* promotes tumor growth via tumor cell toll-like receptor 2 signaling. *Cancer Res* 2007; 67: 4346-52.
100. Jego G, Bataille R, Geffroy-Luseau A, et al. Pathogen-associated molecular patterns are growth and survival factors for human myeloma cells through Toll-like receptors. *Leukemia* 2006; 20: 1130-7.
101. Bohnhorst J, Rasmussen T, Moen SH, et al. Toll-like receptors mediate proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Leukemia* 2006; 20: 1138-44.
102. Adams S. Toll-like receptor agonists in cancer therapy. *Immunotherapy* 2009; 1: 949-64.
103. Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, et al. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med* 2007; 13: 552-9.
104. Makkouk A, Abdelnoor AM. The potential use of Toll-like receptor (TLR) agonists and antagonists as prophylactic and/or therapeutic agents. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2009; 31: 331-8.

105. Gawchik SM, Saccar CL. Pollinex Quattro Tree: allergy vaccine. *Expert Opin Biol Ther* 2009; 9: 377-82.
106. Krieg AM. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 471-84.
107. Hennessy EJ, Parker AE, O'Neill LA. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 293-307.
108. Dunne A, Marshall NA, Mills KH. TLR based therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* 2011; 11: 404-11.
109. Hofmann MA, Kors C, Audring H, et al. Phase 1 evaluation of intralesionally injected TLR9-agonist PF-3512676 in patients with basal cell carcinoma or metastatic melanoma. *J Immunother* 2008; 31: 520-7.
110. Zuany-Amorim C, Hastewell J, Walker C. Toll-like receptors as potential therapeutic targets for multiple diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1: 797-807.
111. O'Neill LA, Bryant CE, Doyle SL. Therapeutic targeting of Toll-like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer. *Pharmacol Rev* 2009; 61: 177-97.

Reimpresos:

Dra. Rosana Pelayo

Laboratorio de linfopoyesis
Unidad de Investigación Médica en
Enfermedades Oncológicas
Hospital de Oncología
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS
Av. Cuauhtémoc, Núm. 330
Col. Doctores
06720, México, D.F.
Tel.: 5627-6900, Ext. 22705
Correo electrónico: rosana.pelayo@yahoo.com,
rosana.pelayo@imss.gob.mx

Recibido el 16 de diciembre 2011.

Aceptado el 22 de mayo 2012.