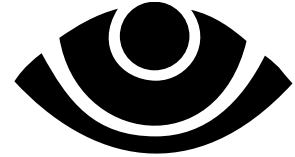




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA
“FUNDACIÓN CONDE DE VALENCIANA”

**POLIMORFISMOS DEL GEN TLR2 COMO FACTORES DE
RIESGO A LA INFECCIÓN OFTÁLMICA POR
ADENOVIRUS**

TESIS DE POSGRADO

Que para obtener el diplomado de especialidad en

OFTALMOLOGÍA

Presenta la

DRA. MÓNICA AMATO ALMANZA

Facultad de Medicina



DIRECTOR DE TESIS:
M. en C. HERLINDA MEJÍA LÓPEZ

MÉXICO, D.F

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A todos los que me permitieron una segunda oportunidad, prometo tomarla con ambas manos.

A Linda por apoyarme a pesar de todo, por ser conmigo como si fueras mi familia, nunca terminare de agradecerte.

A Héctor por ayudarme siempre, por hacerme sonreír aún cuando parecía imposible, gracias por ser mi maestro y amigo.

A Arturo y Juan Carlos, personas clave en mi vida, gracias por participar en el rumbo que tomaron las cosas después de mis dos obstáculos profesionales más grandes hasta el momento.

A Jonathan y Maricarmen que estuvieron presentes en momentos difíciles y siempre me extendieron la mano.

A familia y amigos que han vivido mis ausencias, y aún así no han dejado de estar a mi lado.

A los amigos que conocí durante estos años de entrenamiento que ya forman parte de mi historia, ha sido un verdadero placer coincidir.

A mamá, papá y lili, las personas más importantes para mi, soy muy afortunada por tenerlos, gracias por ayudarme a alcanzar mis sueños.

Especial agradecimiento al QFB Héctor Javier Pérez Cano por el apoyo técnico
proporcionado para la elaboración de este trabajo

“Si lloras por haber perdido el sol,
las lagrimas no te dejarán ver las estrellas”

Rabindranath Tagore

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1-3
II.	OBJETIVO.....	4
III.	JUSTIFICACIÓN.....	4
IV.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	5-6
V.	RESULTADOS.....	7
VI.	DISCUSIÓN.....	8-9
VII.	CONCLUSIONES.....	10
VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	11-13

INTRODUCCION

Los Adenovirus (Ad) causan múltiples enfermedades clínicas que afectan al sistema ocular, respiratorio, urinario y gastrointestinal. Las manifestaciones clínicas varían de esporádicas a epidémicas sin producir signos o síntomas patognomónicos, son usualmente agudas y autolimitadas, pero en niños muy pequeños pueden ser fatales o estar asociados con daños crónicos. Se conocen más de 100 genotipos y se han identificado 6 subgéneros (A-F), basados en varias características biológicas y moleculares; se han reportados 51 de ellos capaces de infectar al hombre.¹⁻³

En la literatura se han reportado genotipos de Ad pertenecientes a los subgéneros B (Ad3 y Ad7), C (Ad1, Ad2, y Ad5), o E (Ad4), como causantes esporádicos de conjuntivitis, conjuntivitis folicular o fiebre faringo-conjuntival. Los brotes hemorrágicos son producidos por el subgénero D, fundamentalmente por Ad8 asociado a queratoconjuntivitis epidémica.⁴⁻⁶ Los genotipos Ad1, Ad2 y Ad5 son adenovirus que generalmente producen cuadros respiratorios, cuando afectan al ojo se presentan causando cuadros menos graves en el pronóstico que los genotipos Ad8, Ad19 y Ad37 los cuales son los agentes comunes en la queratoconjuntivitis epidémica y son responsables de la infección ocular, por adenovirus, más contagiosa y discapacitante.^{7,8}

En la queratoconjuntivitis epidémica, Ad induce una respuesta inflamatoria aguda intensa, los signos clínicos incluyen epífora, edema palpebral, formación de pseudomembranas conjuntivales y hemorragia y queratitis epitelial punteada o geográfica. En ausencia de una terapia antiviral efectiva, el tratamiento incluye, compresas frías, lágrimas artificiales y, en casos seleccionados,

antibióticos tópicos y/o corticoesteroides. Incluso con tratamiento de soporte, la intensa respuesta inflamatoria conjuntival puede llevar a la formación de simbléfaron permanente y ojo seco. En la córnea, se desarrollan típicamente múltiples infiltrados subepiteliales (ISE) en los primeros 7-10 días tras el inicio de los signos clínicos de infección que pueden persistir durante meses o años. Los ISE son casi literalmente el *sine qua non* de la queratoconjuntivitis epidémica. En un estudio realizado con pacientes diagnosticados con queratoconjuntivitis epidémica, un tercio de esa población presentó ISE durante más de 45 días desde el inicio del cuadro.⁹

Por lo anterior descrito, se han realizado esfuerzos para identificar los factores que propician e influyen en el grado de severidad en el huésped así como el pronóstico visual del paciente. Entre los factores que se han estudiado están la respuesta inmune, la cual puede influir en el daño directo. Los mecanismos que deciden la respuesta inicial del hospedero dependen de la respuesta inmune innata mediada por citocinas proinflamatorias, fundamentales en el establecimiento de la respuesta inmune adaptativa, la cual provee protección a largo término. Recientemente se ha dado una particular atención al estudio de los receptores de la respuesta inmune innata. Las interacciones tempranas entre los patógenos y las células hospederas son críticas en la instalación de la infección. Estos receptores conocidos como Receptores de Reconocimiento de Patrones (RRP), identifican Patrones Moleculares de Patógenos (PAMP) altamente conservados, y dirigen la efectividad de la respuesta inmune adaptativa, quien limita o posibilita la exacerbación de la infección.¹⁰

Se ha demostrado que los receptores tipo Toll (TLRs), desempeñan un papel esencial en accionar la respuesta inmune innata reconociendo una gran

variedad de patrones moleculares asociados de bacterias, virus, protozoos, y hongos. Los TLRs se expresan en células de la respuesta inmune innata e inician señales debido a la interacción con los antígenos que reconocen (ligandos específicos), dirigiendo la respuesta inflamatoria, que intenta eliminar al patógeno y lleva a la respuesta adaptativa.¹⁰ En humanos se han identificado diez TLRs (TLR1–TLR10).^{10,11}

El TLR2 es un receptor particularmente especial, debido a que posee un mecanismo único de reconocimiento de ligandos en donde coopera con otros TLR miembros de la familia, especialmente TLR1 y TLR6.¹² Existen varios trabajos que demuestran que herpes virus simple tipo 1 (HSV1), herpes virus tipo 2 (HSV2), Citomegalovirus (CMV) y virus sincicial respiratorio (VSR), inducen citocinas proinflamatorias dependiente de TLR2 y que son un intento de la célula para inducir protección.¹³⁻¹⁵

Se han identificado variantes genéticas conocidas como polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), en los genes que codifican para los TLRs. En TLR2 se han reportado los SNPs Arg677Trp, Arg753Gln asociados a la susceptibilidad y severidad a infecciones virales.^{14,16}

En este estudio nos propusimos estudiar los SNP de la región citosólica (dominio TIR) debido a que se ha relacionados con la unión de la molécula adaptadora MyD88, evento crítico en la activación celular por TLR2.¹⁴

OBJETIVO

Investigar la relación entre los SNPs Arg677Trp, Arg753Gln del dominio TIR del gen TLR2 y la infección ocular por adenovirus en una población Mexicana.

JUSTIFICACIÓN

Se han reportado seis SNPs del gene TLR2 que cambian aminoácidos de la parte citosólica del receptor TLR2, pero únicamente 2 polimorfismos; Arg677Trp, Arg753Gln que se encuentran en el dominio TIR del gen de este receptor, se han relacionados con la unión deficiente de la molécula adaptadora MyD 88, este evento influye la disminución de la activación de NF- κ B, y por lo tanto altera la respuesta inflamatoria, lo que lleva a un riesgo creciente a infecciones por lo que una señalización incorrecta mediada por TLR2 es un factor de riesgo a infecciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 40 muestras históricas de raspado conjuntival de pacientes con diagnóstico clínico de conjuntivitis por Adenovirus, confirmado por PCR. Como controles fueron estudiadas muestras de sangre de 40 individuos de población abierta sin antecedente conjuntivitis folicular y clínicamente sanos.

Extracción de DNA.

La extracción de ADN se realizó con el mini kit QIAamp (QIAGEN, Sciences. Maryland, USA) según protocolo, brevemente: 200 µl de la muestra fueron incubados a 56°C/10min, en un buffer de extracción en presencia de proteinasa K. Se precipitó con etanol al 100% y se pasó a una columna de QIAamp; se hicieron dos lavados con los buffers correspondientes y se eluyó con buffer libre de ADNasas. El material genético fue almacenado a -20°C hasta su identificación.

PCR específico para el sitio TIR de TLR2.

Se realizó PCR de las posiciones nucleotídicas 2170 al 2570 del gen de TLR2. Esta región corresponde a una fracción del sitio citosólico del receptor conocido como dominio TIR, en donde se encuentran los SNPs Arg677Trp y Arg753Gln. Cada reacción fue hecha en un volumen total de 20µl conteniendo 10 µl de la HotStar Taq Master Mix Polimerase (QIAGEN Sciences. Maryland, USA), con 2.5U de Taq polimerasa, 1.5nM de Mg₂Cl, 200µM de cada dNTP, 1X del buffer de reacción y 0.5 µM de los oligonucleótido TLR2F **5'-atgcctactgggtggagaacct-3'** y TLR2R **5'-ctgagagctgcgataaagtc-3'**. El producto de amplificación es de 411pb. La amplificación fue realizada utilizando el programa de un ciclo a 95°C/15 min, y 40

ciclos a 94°C/1min, una Tm de 59.2°C/1min 72°C/1min y un ciclo de extensión a 72°C/10min. La reacción se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer Co. Norwalk, Connecticut). Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio (1ug/ml). Se usó como marcador de pesos moleculares el Ready-Load 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, L.T.). Las bandas con el amplificado fueron cortadas para su posterior purificación utilizando los reactivos de Qiaex II kit (Qiagen, Hilden, Germany).

Secuenciación del amplificado TIR.

El fragmento de 411 pb fue procesado por secuenciación automatizada directa por el método de terminadores fluorescentes (Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando 15ng del DNA purificado utilizando un programa de temperaturas que incluyen 25 ciclos de desnaturalización a 97°C por 30 segundos, una temperatura de alineamiento de 50°C por 15 segundos y una temperatura de extensión de 60°C por 4 minutos. El producto obtenido se analizó en un secuenciador ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Las secuencias se compararon con la forma silvestre (GeneBank) de manera manual debido a que el amplificado es sólo de 411 pb.

Análisis de resultados.

La relación estadística entre los polimorfismos encontrados en el dominio TIR de TLR2 y la infección por adenovirus, se investigó utilizando X^2 para comparar la frecuencia alélica y genotípica.

RESULTADOS

Se procesaron 40 muestras de pacientes con infección con adenovirus para la secuenciación del dominio TIR de TLR2 con el objetivo de buscar los SNPs Arg677Trp y Arg753Gln. Las frecuencias alélicas observadas para Arg677Trp fue del 100% para el alelo C y 0% para el alelo T en pacientes y controles mientras que, para Arg753Gln33 la frecuencia alélicas fue del 100% para el alelo G y el alelo A estuvo ausente. Resulta importante mencionar que se encontró en cuatro pacientes infectados y en cuatro controles, una variante polimórfica no esperada, Phe707Phe, un SNP sinónimo (figura 1), que por el número de muestra estudiada el análisis de X^2 no reporto resultados estadísticamente significativos.

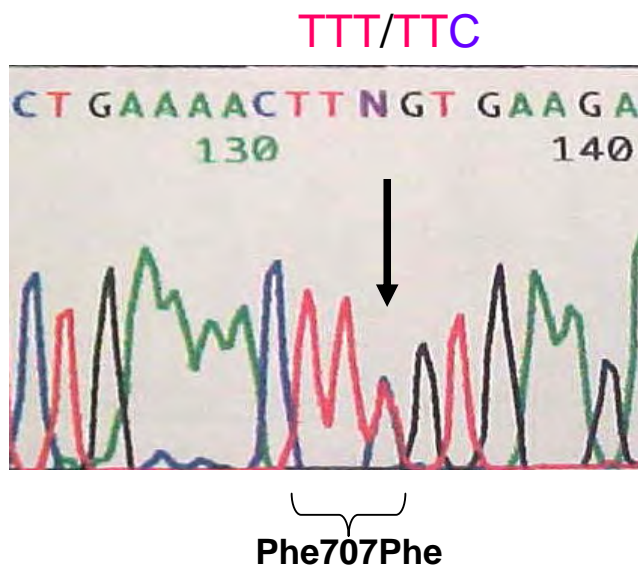


Figura 1. Electroferograma en donde se indica con una flecha el polimorfismo de TTT (Phe) por TTC (Phe) en el aminoácido 707 para la región TIR deL Gen TLR2.

DISCUSIÓN

La respuesta inmune contra adenovirus ha sido muy estudiada debido a que este virus se ha propuesto como un vector que puede portar material genético, característica importante en la terapia génica. Es bien conocido que los Ad utilizan el receptor para coxsackievirus y Ad (CAR) para adherirse y entrar a la célula, además está demostrado que la unión a este receptor estimula la respuesta inmune.¹⁷ Otra vía de estimulación podría estar inducida por el virus a través de TLRs.

El papel de TLR2 en la respuesta inducida por Ad aún no es claro, planteamos que al menos en parte, la respuesta inflamatoria inducida por la presencia del virus podría estar mediada por este receptor. Appledorn DM y colaboradores en un estudio en donde utiliza a Ad como vector, reportan que el virus puede inducir respuesta inflamatoria vía señalización de MAPK, por activación de TLR2 y que hay una respuesta inmune adaptativa, parcialmente dependiente de TLR2 y TLR9.¹⁸ Además, se ha reportado que mediante ligandos o agonistas de TLR2 se puede inducir protección contra HSV2, a nivel vaginal, por la generación sistémica de linfocitos T CD8+.¹⁹

Jin X y colaboradores estudiaron el RNAm de TLRs en corneas sanas. Encontraron que TLR1, 2, 3, 4 y 6 se expresan en mayor proporción que TLR7, 8 y 9, y en menor cantidad TLR5 y 10. Además, encontraron que en corneas con queratitis estromal herpética activa estuvieron sobreexpresados TLR4, 7, 8 y 9, sin embargo en las corneas con queratitis herpética no activa sólo el RNAm del TLR7 estuvo sobreexpresado. El hecho de que en corneas sanas se encuentre una mayor cantidad de TLR2 y TLR1 y 6, con quienes TLR2 forma dímeros para el reconocimiento de sus ligandos, podría indicar que en la primo

infección por Ad, el reconocimiento del virión es por TLR2 el cual está dirigiendo la respuesta inflamatoria inicial.²⁰

Por último, reportes recientes indican que variantes genéticas (polimorfismos), en los genes de la respuesta inmune innata, están asociados con desordenes en la respuesta inflamatoria. Se cree que deficiencias a nivel de RRP afecta la maduración del sistema inmune e inclina la balanza hacia la enfermedad. El papel de los factores genéticos es determinante en la susceptibilidad a la infecciones y se ha hecho mas evidente en la actualidad; algunas personas parecen estar predispuestas a ciertas infecciones, mientras que otras son protegidas.²¹ Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) Arg677Trp, Arg753Gln en el gen TLR-2 se asocian con alto riesgo de infecciones severas como son las producidas por HSV 2, HSV 1 Y CMV. Estudios recientes han demostrado que los SNPs en el gen TLR2, dentro del dominio TIR (aminoácidos 643-784) son muy importantes para la dimerización y señalización mediada por TLR.^{16, 22-24} En este estudio nos planteamos estudiar los polimorfismos Arg677Trp, Arg753Gln, antes mencionados, que con mayor frecuencia se han reportado asociados a la susceptibilidad a infecciones. La población mexicana estudiada, no presentó ninguno de los dos polimorfismos buscados. Por otra parte, resulta interesante el hallazgo del polimorfismo Phe707Phe en 4 pacientes y en 4 controles. Este SNP sinónimo no ha sido reportado e ninguna otra población, por lo que proponemos el análisis de un grupo mayor de muestras para conocer si es un marcador de la población hispana o particularmente de la población mexicana.

CONCLUSIONES

La relevancia de los resultados obtenidos radica en que los polimorfismos Arg677Trp, Arg753Gln no están presentes en la población estudiada, lo que sugiere que en la población mexicana no están asociados a la susceptibilidad a la infección por adenovirus. En la población estudiada se encontró el polimorfismo Phe707Phe, que hasta el momento no se ha reportado su asociación con riesgo a infecciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Schmitz H, Wigand R, Heinrich W. Worldwide epidemiology of human adenovirus infections. *Am J Epidemiol* 1983; 117:455-466.
2. Horwitz MS. Adenoviruses Chapter 68. In: Fields DM, Knipe PM, Howley, *et al.* *Fields Virology*. Third Ed. Philadelphia. Lippincott Raven Publishers 1996; 2155.
3. De Jong JC, Wermenbol AG, Verweij-Uijterwaal MW, Slaterus KW, Wertheim-Van Dillen P, Van Doornum GJ *et al.* Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3940-3945.
4. Cooper RJ, Yeo AC, Bailey AS, Tullo AB. Adenovirus polymerase chain reaction assay for rapid diagnosis of conjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:90-95.
5. Takeuchi S, Itoh N, Uchio E, Aoki K, Ohno S. Serotyping of adenoviruses on conjunctival scrapings by PCR and sequence analysis. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1839-1845.
6. Shepetiuk SK, Norton R, Kok T, Irving LG. Outbreak of adenovirus type 4 conjunctivitis in South Australia. *J Med Virol* 1993; 41:316-318.
7. Jernigan JA, Lowry BS, Hayden FG, Kyger SA, Conway BP, Groschel DH, *et al.* Adenovirus type 8 epidemic keratoconjunctivitis in an eye clinic: risk factor and control. *J Infect Dis* 1993; 167:1307-1313.
8. Adhikary AK, Numaga J, Kaburaky T, Kawashima H, Kato S, Araie M, *et al.* Rapid detection and typing of oculo-pathogenic strain of subgenus D adenoviruses by fiber-based PCR and restriction enzyme analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42:2010-2015.

9. Butt AL, Chodosh J. Adenoviral keratoconjunctivitis in a tertiary care eye clinic. *Cornea* 2006; 25:199-202.
10. Sandor F and Buc M. Toll like receptors. I. Structure, function and their ligands. *Folia Biologica (Praha)* 2005; 51:148-156.
11. Du X, Poltorak A, Wei Y, Beutler B. Tree novel mammalian toll-like receptor: gene structure, expression and evolution. *Eur Cytokine Netw* 2000; 11:362-371.
12. Hajjar AM, O'Mahony DS, Ozinsky A, Underhill DM, Aderem A, Klebanoff SJ y Wilson CB. Cutting edge: Functional interaction between Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J Immunol* 2001; 166:15-19.
13. Morrison LA. The Toll of herpes simplex virus infection. *Trends Microbiol* 2004; 12:353-356.
14. Texereau J, Chiche JD, Taylor W, Choukroun G, Comba B, Mira JP. The importance of Toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections. *Clin Infect Dis* 2005; 41:S408-415.
15. Murawski M R, Bowen GN, Cerny AM, Anderson LJ, Haynes LM, Tripp RA, Kurt-Jones EA, Finberg RW. Respiratory syncytial virus activates innate immunity through Toll-like receptor 2. *J Virol* 2009; 83:1492-1500.
16. Bochud PY, Magaret AS, Koelle DM, Aderem A, Wald A. Polymorphisms in TLR2 are associated with increased viral shedding and lesion rate in patients with genital herpes simplex virus Type 2 infection. *J Infect Dis* 2007; 196:497-498.
17. Thomas CE, Edwards P, Wickham TJ, Castro MG, Lowenstein PR. Adenovirus binding to the coxsackievirus and adenovirus receptor or integrin is not required to elicit brain inflammation but is necessary to transduce specific neural cell types. *J Virol* 2002; 76:3452-3460.

18. Appledorn DM, Patial S, McBride A, Godbehere S, Van Rooijen N, Parameswaran N, Amalfitano A. Adenovirus vector-induced innate inflammatory mediators, MAPK signaling, as well as adaptive immune responses are dependent upon both TLR2 and TLR9 in vivo. *J Immunol.* 2008; 181:2134-2144.
19. Zhang X, Chentoufi AA, Dasgupta G, Nesburn AB, Wu M, Zhu X Carpenter D, Wechsler SL, You S, BenMohamed L. A genital tract peptide epitope vaccine targeting TLR-2 efficiently induces local and systemic CD8+ T cells and protects against herpes simplex virus type 2 challenge. *Mucosal Immunol* 2009; 2:129-143.
20. Jin X, Qin Q, Chen W, Qu J. Expression of toll-like receptors in the healthy and herpes simplex virus-infected cornea. *Cornea.* 2007; 26:847-852.
21. Hill Av. The genomics and genetics of human infectious disease susceptibility. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001; 2:373-400.
22. Necil Kutukculer, Betül Sozeri Yeniay Guzide Aksu and Afig Berdeli: Arg753Gln Polymorphism of the Human Toll-like Receptor-2 Gene in Children with Recurrent Febrile Infections, *Biochemical genetics* 2007; 45:7-8
23. Meriem Ben-Ali, Mohamed-Ridha Barbouche, Soufia Bousnina, Abdellatif Chabbou, and Koussay Dellagi: Toll-Like Receptor 2 Arg677Trp Polymorphism Is Associated with Susceptibility to Tuberculosis in Tunisian Patients, *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11:625-626.
24. Tobias Woehrle, Weidong Du, Achim Goetz, Hsin-Yun Hsu, Thomas O. Joos, Manfred Weiss, Ute Bauer, Uwe B. Brueckner and E. Marion Schneider :Pathogen specific cytokine release reveals an effect of TLR2 Arg753Gln during *Candida* sepsis in humans. *Cytokine* 2008; 41: 322-329.