



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FUNDACIÓN HOSPITAL NUESTRA SEÑORA DE LA LUZ, I.A.P.

DEPARTAMENTO DE CÓRNEA Y CIRUGÍA REFRACTIVA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

**POLIMORFISMO – 1486 T/C DE TLR 9 COMO FACTOR DE
RIESGO EN BLEFARITIS INFECCIOSA**

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANO OFTALMÓLOGO

PRESENTA

DRA. DANIELA GARCÍA ROMERO

ASESOR DE TESIS:

DR. ALEJANDRO BABAYAN SOSA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. HÉCTOR JAVIER PÉREZ CANO



HOSPITAL
de la **LUZ**
FUNDACIÓN HOSPITAL NUESTRA SEÑORA DE LA LUZ, IAP

CD. MÉXICO, D. F.

JULIO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DR. ALEJANDRO BABAYÁN SOSA

MÉDICO ADSCRITO AL DEPARTAMENTO DE CÓRNEA Y CIRUGÍA REFRACTIVA
FUNDACIÓN HOSPITAL NUESTRA SEÑORA DE LA LUZ I.A.P.

DR. ALEJANDRO BABAYÁN SOSA

JEFE DE ENSEÑANZA
FUNDACIÓN HOSPITAL NUESTRA SEÑORA DE LA LUZ I.A.P.

DR. JAIME LOZANO ALCÁZAR

PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIDAD
FUNDACIÓN HOSPITAL NUESTRA SEÑORA DE LA LUZ I.A.P.

DR. OSCAR BACA LOZADA

DIRECTOR MÉDICO
FUNDACIÓN HOSPITAL NUESTRA SEÑORA DE LA LUZ I.A.P.

DATOS GENERALES

AUTOR

Dra. Daniela García Romero

Residente de tercer año de la especialidad de Oftalmología

Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz I.A.P.

ASESORES

Dr. Alejandro Babayán Sosa

Médico Adscrito del departamento de córnea y cirugía refractiva

Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz I.A.P.

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Héctor Javier Pérez Cano

Centro de Investigación Biomédica

Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz I.A.P.

TESIS:

Título: *"Polimorfismo -1486 T/C del gen TLR 9 como factor de riesgo en blefaritis infecciosa"*

DEDICATORIA

A mis padres, Rosalba y Jonás, por siempre tener fé en mi, por su esfuerzo sin límites, su amor incondicional, gracias a ellos he llegado tan lejos.

A mi hermano Eduardo por su amor y admiración, por convertir los días difíciles en momentos fugaces.

A mi abuelita Lucía por estar conmigo siempre, por compartirme su sabiduría y su amor infinito.

A mi pareja Ezequiel, por compartir los momentos buenos y malos, por ser mi motivación a diario, por su apoyo constante y por estar a mi lado cumpliendo nuestros sueños.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a dios por concederme un sueño más en mi vida.

A mis amigos (as) con los que he convivido estos años por hacer cada día diferente en mi vida.

A mis maestros del Hospital Fundación Nuestra Señora de la Luz por enseñarme el amor por la oftalmología, por su enseñanza diaria y disciplina.

ÍNDICE

• RESUMEN.....	1
• ABSTRACT.....	3
• INTRODUCCIÓN.....	5
• MARCO TEÓRICO.....	6
○ DEFINICIÓN DE BLEFARITIS.....	6
○ TIPOS DE BLEFARITIS.....	7
○ ASOCIACIÓN CON TLR.....	8
• JUSTIFICACIÓN.....	12
• PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
• HIPÓTESIS.....	14
• OBJETIVOS.....	15
• METODOLOGÍA.....	16
• RESULTADOS.....	20
• DISCUSIÓN.....	23
• CONCLUSIÓN.....	24
• BIBLIOGRAFÍA.....	25

RESUMEN

Objetivo

Demostrar la asociación entre el polimorfismo -1486T/C de la región promotora del gen TLR 9 con blefaritis infecciosa.

Material y Métodos

Se obtuvieron 30 muestras por raspado palpebral con blefaritis infecciosa, así como 30 muestras de sujetos sin patología ocular. Se realizó amplificación por PCR de la región promotora del gen de TLR 9, posteriormente se purificaron los productos de amplificación y se analizó la secuencia del gen para la búsqueda del polimorfismo -1486T/C. Se utilizó Chi cuadrada para realizar el análisis entre la asociación de blefaritis infecciosa y la región promotora.

Resultados

La frecuencia alélica -1486T se encontró en un 62.5% en pacientes con blefaritis infecciosa, y sólo en un 25% en sujetos control. Nuestros resultados demostraron diferencias significativas entre pacientes y controles ($p < 0.0001$) y se encontró un riesgo relativo de 2.48 y una razón de momios de 4.89.

Conclusión

En este estudio realizado en población mexicana sobre infección por blefaritis y la región promotora del gen de TLR 9, encontramos una alta frecuencia para el

alelo -1486T en pacientes con blefaritis infecciosa. Lo cual indica que existe una relación entre el polimorfismo -1486T y la susceptibilidad para desarrollar blefaritis infecciosa en la población estudiada.

ABSTRACT

Purpose

To demonstrate the association between polymorphism of TLR9 gene promoter region with infectious blepharitis.

Methods

Thirty samples of palpebral scraping from patients with infectious blepharitis, and thirty samples from not infected subjects, as controls, were studied. The promoter region of toll like receptor 9 (TLR 9) gene was amplified by PCR, and then, the PCR products were purified and analyzed the presence of SNP - 1486T/C by direct sequencing. Fisher Chi-square was used to found the association between blepharitis and the polymorphism in the promoter region.

Results

The allelic frequency of -1486T was 62.5% of the promoter region of TLR 9 gene in patients, and in controls was 25%. Our results showed significantly differences between patients and control subjects ($p < 0.0001$) and the relative risk was 2.48 and the Odds Ratio 4.89.

Conclusions

Our results show significant differences between patients and controls ($p < 0.0001$). In this study of Mexican population on infectious blepharitis and polymorphism of the promoter region of TLR 9 gene, we found high frequency for -1486T allele in patients with infectious blepharitis, which indicates that there

is relationship between -1486T polymorphism in TLR 9 gene and is associated with the susceptibility for infectious blepharitis in the studied population.

INTRODUCCIÓN

Los receptores tipo Toll (TLR) son un grupo de familias las cuales representan una de las principales formas de reconocer patógenos, la transducción de señales por estos receptores es fundamental para la defensa del huésped contra muchos microorganismos patógenos y también subyace una gran carga de enfermedades en humanos. La estimulación de el TLR 9 activa células B y dendríticas, causando así que los linfocitos tipo Th1 tengan una respuesta inmune ante patógenos. Teniendo así un papel muy importantes en los sistemas de inmunidad congénita y adquirida por medio del reconocimiento de ADN de bacterias. Existen estudios previos que han demostrado que un poliformismo de un solo nucleótido de TLR 9 ha sido asociado a enfermedades infecciosas, así como a enfermedades autoinmunes.

Existen estudios específicos sobre el polimorfismo -1486 T/C en cáncer cervicouterino, en donde se ha encontrado a este como un factor de riesgo genético. Estos hallazgos se han basado ya en la evidencia al existir disregulación en la señalización por parte de TLR se presenta una disregulación en la relación con citocinas pro y antiinflamatorias, lo cual conlleva a presentar un riesgo elevado para desarrollar enfermedades bacterianas, inmunológicas y neoplásicas.

MARCO TEÓRICO

La blefaritis está caracterizada por una relación entre flora ocular y una disfunción de glándulas de meibomio lo cual conlleva signos de inflamación crónica en párpados, cambios corneales y conjuntivales, así como síntomas de malestar ocular. Esta patología fue descrita en 1908 por Elsching , siendo una de las condiciones más frecuentes por las cuales un paciente busca atención médica. Es una condición médica crónica común en todo el mundo, característicamente puede afectar a cualquier grupo de edad, en la cual los párpados presentan inflamación principalmente. ¹

McCulley et al. ha expandido las dos categorías fundamentales en la inflamación de párpados en 6 diferentes categorías, la primera causada por estafilococo la cual se presenta de forma más frecuente en mujeres jóvenes, hasta el 46% se trata de estafilococo aureus y el resto corresponde a estafilococo epidermidis.

El segundo grupo abarca pacientes de edad avanzada con evidencia de enfermedad seborreica, se trata de una enfermedad crónica presentada de igual forma en hombres y mujeres, y la localización más frecuente es en la porción anterior de el borde palpebral. El tercer grupo se refiere a la conincidencia de enfermedad seborreica y estafilocócica, presentando un mayor grado de inflamación. El cuarto grupo lo definió como seborrea meibomiana, en el cual los pacientes presentan alteraciones de las glándulas de meibomio. Tanto el quinto y sexto grupo son similares, presentan

inflamación de las glándulas de meibomio, presentando un borde palpebral sin alteraciones.²

Dentro de la flora que se puede encontrar de forma normal en los párpados el 94% corresponde a estafilococo epidermidis, 87% a propionibacterium acnes y el resto a otro de tipo de patógenos, cabe mencionar que estafilococo aureus solo se encuentra en un 13% de forma normal.³

Estos microorganismos producen lipasas las cuales alteran la composición lipídica de las glándulas de meibomio. Los medicamentos antibióticos utilizados en la actualidad tienen como función reducir la producción de lipasas, así como los efectos quimiotácticos de los neutrófilos, sin dejar de paso la actividad contra las colagenasas y metaloproteinasas.³

Los signos clínicos incluyen prurito, irritación, sensación de cuerpo extraño, epífora, fotofobia, visión borrosa, costras fibrinosas endurecidas rodeando los anexos, se pueden presentar úlceras en el margen palpebral cuando estas son removidas. La inflamación de los párpados se manifiesta con eritema, edema, engrosamiento, hiperqueratinización e irregularidades del margen palpebral. Los signos de inflamación palpebral crónica son madarosis o pérdida de pestañas, triquiasis refiriéndose a una dirección anómala de las pestañas, tilosis o engrosamiento de borde palpebral, poliosis considerada como pérdida de pigmentación de pestañas.

En general cuando se habla del término blefaritis estafilocócica se hace referencia a los casos en los cuales existe una infección bacteriana de los

párpados y de forma frecuente de la conjuntiva, de forma predominante, y no así cuando se hace referencia a solo una disfunción de las glándulas de meibomio, en donde solo existe la presencia de secreción producida de forma crónica, la cual tiene efecto irritativo en el margen palpebral así como en la conjuntiva. ⁴

Algunos pacientes pueden presentar deficiencia de la película lagrimal, existe una secreción de forma excesiva de productos lipídicos por parte de las bacterias, las cuales modifican la película lagrimal dando como consecuencia una inestabilidad de la misma, provocando una pérdida por evaporación. ⁴

Existen condiciones inflamatorias con una significativa asociación a blefaritis como gastritis, úlcera péptica, asma, artropatías y CUCI (Colitis Ulcerativa Crónica Inespecífica), así como algunas enfermedades cardiovasculares, psicológicas, entre otras. ⁵

Dentro de las enfermedades en las cuales se encuentra de manera muy frecuente la blefaritis como patología concomitante, está la Rosácea, una condición patológica en la cual existe afección de la piel incluyendo afección ocular, caracterizándose por una producción excesiva de secreción sebácea, acompañada de blefaritis crónica. ⁶

Esta patología predispone a los pacientes para presentar blefaritis principalmente creando un ambiente en la piel basado en la congestión de glándulas productoras de material oleoso, necesarias para el correcto funcionamiento de la dermis y epidermis, así como del borde palpebral. ⁷

Uno de los principales retos para el sistema inmune innato, es contar con la habilidad de discriminar entre un gran número de probables patógenos, con el uso de un pequeño número de receptores. Los receptores tipo toll, por sus siglas en inglés TLR son de los mejores tipos de moléculas para reconocimiento en mamíferos teniendo un papel importante para el reconocimiento de diversos patógenos, y a su vez para la activación de la inmunidad innata, conllevando al desarrollo de la inmunidad adaptativa.⁸

Algunas funciones han sido investigadas por asociación de la incidencia de alguna enfermedad con los diferentes polimorfismos en genes que participan en la señalización de los TLRs. Estos estudios han enseñado que la función de los TLRs participa en diferentes enfermedades como sepsis, inmunodeficiencias, aterosclerosis y asma.⁹

Una gran diversidad de estudios han demostrado que diferentes TLR's son expresados en múltiples tejidos oculares así como en células, con un papel importante en la defensa contra infecciones bacterianas.¹⁰

También se ha estudiado la presencia en otro tipo de enfermedades oculares lejos de la etiología infecciosa, por ejemplo Kindzelskii AL et al han demostrado la participación de TLR 4 en la señalización transmembrana en respuesta al anclaje de los segmentos externos de los fotorreceptores, cobrando importancia en enfermedades como Degeneración Macular Relacionada a la Edad.¹¹

Cada vez nos acercamos más en aceptar o demostrar el hecho de que existe una interacción tanto dinámica como compleja entre las anomalías de la superficie palpebral, el sistema inmune del paciente y la inmunidad natural de párpados y la película lagrimal.

Akilov *et al*, realizaron un estudio evaluando la respuesta inmune en demodicosis, mencionando que la disposición de los linfocitos para experimentar apoptosis se ve aumentada de forma paralela al aumento de ácaros, esto podría ser el resultado de una inmunosupresión local causada por los ácaros, que sobreviven en el huésped gracias a esta condición.¹²

Se ha descubierto que los TLR son capaces de regular la producción de citocinas en respuesta a ligandos endógenos, los cuales son liberados posterior a daño en algún tejido, lo cual sugiere que estos pueden mantener una respuesta inflamatoria aún en ausencia de algún patógeno.¹²

Chang *et al* en 2007 demostraron que existe alteración en la expresión de TLR4 y TLR 2 en pacientes con uveítis, lo cual podría ser consistente con un estado de tolerancia a endotoxinas en pacientes con dicha patología, a su vez apoya esta idea en infecciones bacterianas.¹³

En diferentes tipos de patología se han estudiado ampliamente los genes y las regiones promotoras de dichos genes, las cuales se encargan de codificar para las diferentes familias de TLR's , hablando no solo de patología autoinmunes si no también de enfermedades infecciosas y de neoplasias.¹⁴

El TLR 9 es expresado por células B, monocitos y mastocitos, induciendo la activación de citocinas pro inflamatorias como la IL 2 (interleucina) y el IFN (interferon). Se han realizado estudios sobre la actividad anti tumoral que confiere este tipo de TLR en neoplasias de pequeño y gran tamaño, en carcinoma colorrectal, prostático y gástrico. ¹⁵

el polimorfismo -1486 T/C ya localizado mediante estudio genético y de PCR en la región promotora del gen para TLR 9, ha demostrado alteración de la función y de la habilidad de este ante las acciones de algún patógeno, incluso en algunas enfermedades aumentando el riesgo de presentar algún tipo de neoplasia. ¹⁶

diferentes estudios han revelado la asociación de este polimorfismo con diferentes enfermedades como asma, enfermedad de Crohn, malaria y aspergilosis pulmonar por mencionar algunas. ¹⁷

No solo destacando la importancia como característica en este tipo de enfermedades, si no en algunas como carcinoma nasofaríngeo, confieren un factor de riesgo importante y pronóstico.

JUSTIFICACIÓN

La blefaritis infecciosa es una enfermedad caracterizada por su respuesta inflamatoria que puede ser leve, moderada o severa y es causada por bacterias, parásitos, hongos y virus, siendo la infección más común la ocasionada por bacterias Gram positivas. Siendo un problema de salud pública muy frecuente, es necesario conocer los aspectos moleculares que están relacionados a esta entidad clínica y hasta el momento no existe información acerca de cómo se relaciona el polimorfismo de la región promotora del gen TLR 9 con la blefaritis infecciosa.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta el momento existen reportes asociados al polimorfismo de la región promotora del gen TLR9 con enfermedades infecciosas tales como malaria, meningitis bacteriana, tuberculosis, uveítis e incluso con enfermedades como el lupus eritematoso, sin embargo, no existen estudios que relacionen el polimorfismo de la región promotora del gen TLR9 con el riesgo de blefaritis infecciosa, por lo cual surge esta pregunta:

¿Existe relación entre el polimorfismo de la región promotora y el riesgo de desarrollar blefaritis infecciosa?

HIPÓTESIS

Existe una relación entre el polimorfismo de la región promotora del gen TLR9 con el riesgo de adquirir una blefaritis infecciosa.

HIPÓTESIS NULA

No existe relación entre el polimorfismo de la región promotora del gen TLR 9 en pacientes con blefaritis infecciosa.

OBJETIVO

Demostrar la asociación entre el polimorfismo de la región no traducida del gen TLR9, que pertenece a la región promotora, con la blefaritis infecciosa.

Objetivos específicos

Realizar PCR y secuenciación para la región promotora TLR 9.

Determinar la frecuencia alélica del polimorfismo de la región promotora de TLR 9 en pacientes con blefaritis infecciosa.

Determinar el riesgo relativo y la razón de momios del polimorfismo de la región promotora de TLR 9 en pacientes con blefaritis infecciosa.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo, descriptivo y transversal en el periodo comprendido de mayo del 2013 a octubre de 2013, en pacientes del Hospital Fundación “Hospital Nuestra Señora de la Luz”

Se estudió a un grupo de 30 pacientes hombres y mujeres, con blefaritis infecciosa y un grupo control de 30 sujetos sin patología ocular, previa firma del consentimiento informado.

El diagnóstico de blefaritis infecciosa se realizó clínicamente, pacientes que refirieron prurito, sensación de cuerpo extraño, eritema en borde palpebral, escama o collarete en pestañas.

El grupo control de sujetos sin patología ocular, fué un grupo de población abierta que acudió por estudio de refracción, sin presentar algún signo clínico de enfermedad ocular infecciosa.

Toma de la muestra

Se realizó un raspado palpebral con un hisopo de rayón utilizando un medio de transporte con antibióticos para su almacenamiento y posterior extracción del ADN.

Se excluyeron a los pacientes con tratamiento tópico aplicado durante dos semanas previas a la toma de muestra. Se eliminaron las muestras que, aun

cumpliendo con los criterios de inclusión, se haya presentado un error en la toma y/o manejo de la muestra.

Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó utilizando un producto comercial (Puregene QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante y el DNA obtenido se almacenó a -80°C hasta el momento de su análisis

PCR y Secuenciación nucleotídica

Se diseñaron los oligonucleótidos para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) los cuales fueron: F= 5'-ACTTACTATGTGCTGGGCACTG-3' y R= 5'-CCTGCTTGCACTTGACTGTGTA-3' que amplifican un producto de 350 pares de bases (pb). Las condiciones adecuadas para llevar a cabo la PCR fueron: HotStarTaq de Invitrogen (Cat.) 10ml, Oligonucleótido F 0.3 ml, Oligonucleótido R 0.3 ml, DNA 4ml ajustando con agua a un volumen final de 20ml. El programa utilizado fue: un ciclo de 95°C durante 10 minutos seguido de 38 ciclos de 95°C/1 minuto, 60°C/1 minuto, 72°C/1 minuto, finalizando con un ciclo de extensión de 72°C durante 10 minutos utilizando un termociclador Axigene/Maxigene.

Posteriormente se llevó a cabo la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 90V durante 40 minutos. Se observó en un fotodocumentador y las bandas de producto de PCR se cortaron y purificaron para después realizar la

secuenciación nucleotídica por el método de terminadores fluorescentes (BigDye). Una vez obtenida la secuenciación, se analizaron los datos en búsqueda de los polimorfismos de interés de la región promotora de TLR9.

Análisis estadístico

La relación estadística entre los polimorfismos encontrados y la blefaritis infecciosa se buscó utilizando la prueba Fisher para comparar la frecuencia alélica entre pacientes y controles, así mismo se determinó el riesgo relativo y la razón de momios entre el polimorfismo y la presentación de blefaritis. El Software utilizado fue el GraphPrism V.5

RESULTADOS

Se analizaron las muestras de 30 pacientes con blefaritis y 30 sujetos control que aceptaron participar en el estudio. Se realizó la PCR para la región promotora del gen TLR9 obteniendo el producto esperado (350pb) Figura 1.

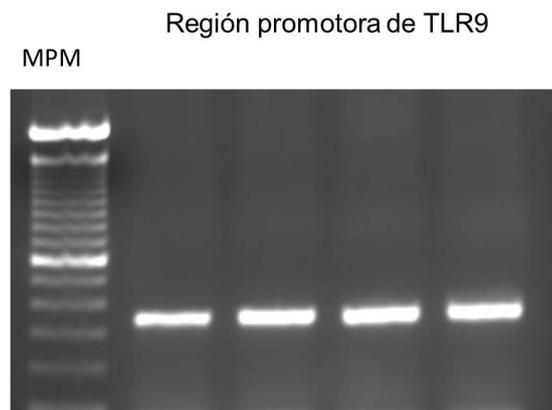


Figura 1. Gel de agarosa que muestra el producto de amplificación de 350pb

Una vez purificados los productos de PCR, se llevó a cabo la secuenciación nucleotídica de la región promotora de TLR9 para el polimorfismo T-1486C Figura 2.

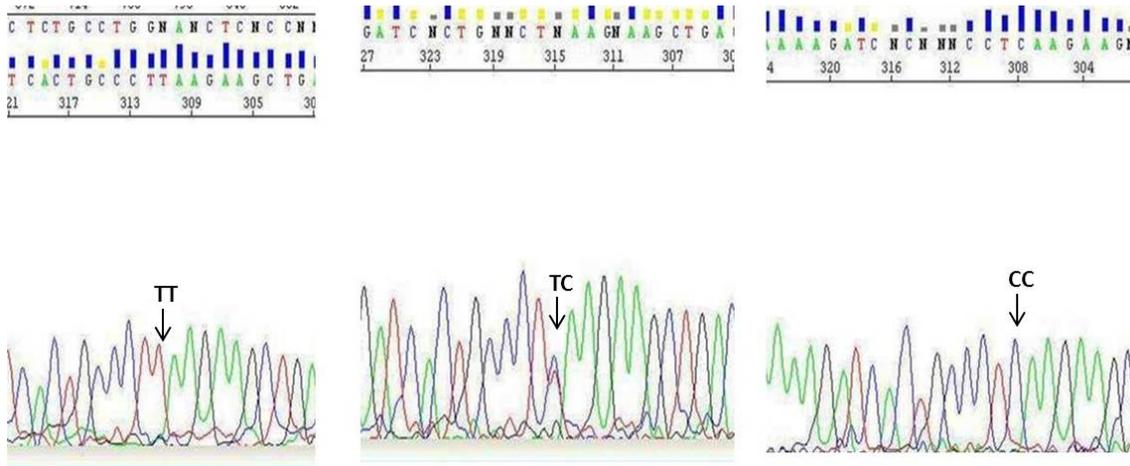
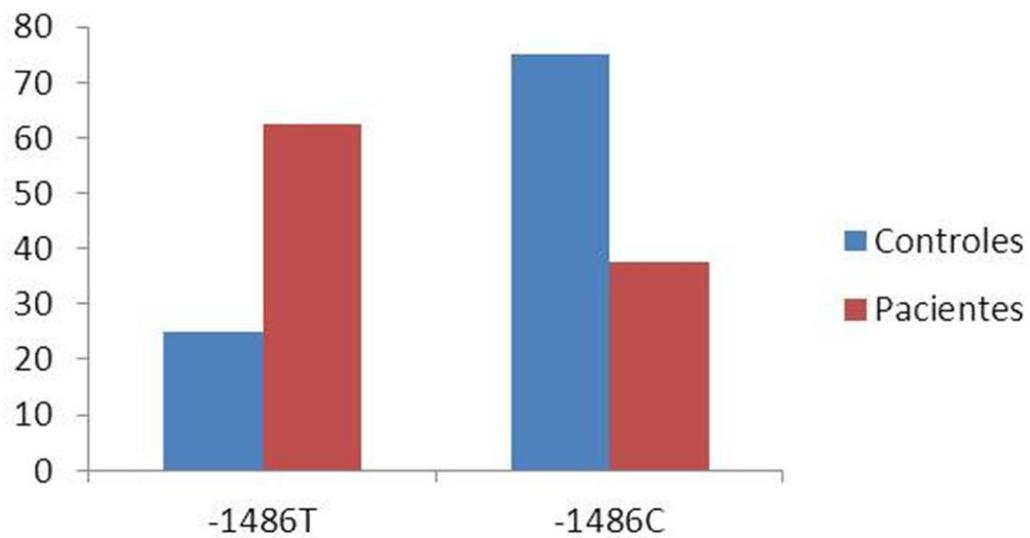


Figura 2. Secuenciación nucleotídica que muestra los diferentes polimorfismos (TT, TC y CC) de la región promotora de TLR9. Cada pico representa una base nitrogenada, cuando existe dos picos en una misma posición, significa que el sujeto es heterocigoto para ese alelo. El código de colores es el siguiente: T = rojo, C = azul, A = Verde y G = negro

Se determinó la frecuencia alélica entre pacientes y controles y se compararon ambos grupos calculando también el riesgo relativo (RR) y la razón de momios (OR) Figura 3.



	Frecuencia alélica	
	-1486T	-1486C
Controles	25%	75%
Pacientes	62.5%	37.5%
RR	2.48	
OR	4.89	P<0.0001

Figura 3. Frecuencia alélica, riesgo relativo (RR) y razón de momios

DISCUSIÓN

Aunque los resultados no son mostrados en el trabajo, los grupos de pacientes y controles estudiados no muestran diferencias significativas entre ellos asociado a edad y sexo.

Al realizar la prueba de chi cuadrada comparando la frecuencia alélica entre pacientes y controles, nuestros resultados muestran diferencias significativas entre ellos con una p menor a 0.0001, el riesgo relativo obtenido para el alelo -1486T fue de 2.48 y la razón de momios de 4.89

Se han realizado estudios del polimorfismo de TLR9 en diferentes enfermedades tales como nefritis lúpica que en el 2013 Ramachandran y colaboradores encuentran que los pacientes portadores del alelo -1486C tienen mayor riesgo de desarrollar la enfermedad.

En un estudio más reciente, Dai y colaboradores encuentran que el alelo -1486C se relaciona con la susceptibilidad de carcinoma nasofaríngeo ¹⁸, sin embargo, nuestro estudio relaciona al alelo -1486T como un factor de riesgo a blefaritis infecciosa, cabe destacar que tanto la nefritis lúpica como el carcinoma nasofaríngeo, no son entidades clínicas infectocontagiosas, puede ser que la diferencia radique en el tipo de respuesta inmunológica que se presenta en una respuesta autoinmune y una respuesta frente a patógenos.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran una alta frecuencia del alelo T en los pacientes lo que sugiere que el polimorfismo -1486T en la región promotora, está asociado con la susceptibilidad de desarrollar blefaritis infecciosa en la población estudiada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Yanoff & Duker, Ophthalmology, 2nd Edition, 2009: 219 – 221.
2. McCulley JP, Shine WE. Changing concepts in the diagnosis and management of blepharitis. *Cornea*. 2000;19:650–8.
3. Joel M. D. , James P. Mc. Bacterial Upases and Chronic Blepharitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27:486-491, 1986
4. Krachmer J.H. MD, Mannis M.J. MD. *Cornea, fundamental diagnosis and Management*. 3rd Edition, Mosby, Elsevier. 2010; 33.
5. Donald N.C., David S. P., Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nature Immunology* . 5, 975 – 979, 2004.
6. Hoang-Xuan T, Rodriguez A, Zaltas MM, Rice BA, Foster CS. Ocular rosacea. A histologic and immunopathologic study. *Ophthalmology*. 1990 Nov;97(11):1468-75.(3)
7. Jingbo Liu, Hosam Sheha, Scheffer C.G. Tseng Pathogenic role of Demodex mites in blepharitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. Oct 2010; 10(5): 505–510.
8. Medzhitov R, Janeway C Jr. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol*. 2000;8:452–456.
9. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease, Donald N Cook, David S Pisetsky & David A Schwartz, *Nature Immunology* 5, 975 – 979, 2004.
10. Song PI, Abraham TA, Park Y, et al. The expression of functional LPS receptor proteins CD14 and toll-like receptor 4 in human corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:2867–2877.

11. Kindzelskii AL, Elnor VM, Elnor SG, Yang D, Hughes BA, Petty HR. Toll-like receptor 4 (TLR4) of retinal pigment epithelial cells participates in transmembrane signaling in response to photoreceptor outer segments. *J Gen Physiol.* 2004;124:139–149.
12. OE Akilov, KY Mumcuoglu et al. Immune response in demodicosis, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, Volume 18, Issue 4, pages 440–444, July 2004.
13. Chang JH, Hampartzoumian T, Everett B, Lloyd A, McCluskey PJ. Changes in Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR4 expression and function but not polymorphisms are associated with acute anterior uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007 Apr;48(4):1711-7.
14. Lee YH, Bae SC, Kim JH, Song GG. Toll-like receptor polymorphisms and rheumatoid arthritis: a systematic review, *Rheumatol Int.* 2013; 34; 111-116.
15. Gan Zhao, John P Vasilakos, Debra Tross et al. Combination therapy targeting toll like receptors 7, 8 and 9 eliminates large established tumors. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2014, 2:12.
16. Xiaoyong Wang, Lening Xue, Yang Yang², Lijuan Xu, Guoxin Zhang. TLR9 Promoter Polymorphism Is Associated with Both an Increased Susceptibility to Gastric Carcinoma and Poor Prognosis. *PLoS One.* 2013 Jun 12;8(6)
17. Natsumi Sakamoto, Hideharu Sekine et al. Association of the toll like receptor 9 gene polymorphisms with behcet's disease in a japanese population. *Fukushima J. Med. Sci.* Vol. 58;2,2012.
18. Dai Q, Li XP, Chai L, Long HA, Yang ZH. Polymorphisms of Toll-like receptor 9 are associated with nasopharyngeal carcinoma susceptibility. *Tumor Biology*, April 2014, Volume 35, Issue 4, pp 3247-3253.