



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**ASOCIACIÓN ENTRE LOS POLIMORFISMOS -1486 T/C Y 1174 G/A DEL GEN
TLR9 Y LA BLEFARITIS INFECCIOSA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

Ana Karen Téllez Alcaide



MÉXICO, D.F.

AÑO 2015



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Saturnino de León Chapa

VOCAL: Profesor: Carmen Adriana Mendoza Rodríguez

SECRETARIO: Profesor: Héctor Javier Pérez Cano

1er. SUPLENTE: Profesor: Beatriz Ruiz Villafan

2º SUPLENTE: Profesor: Mario Adán Moreno Eutimio

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA, FUNDACIÓN HOSPITAL NUESTRA SEÑORA DE LA LUZ

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Héctor Javier Pérez Cano

SUSTENTANTE (S):

Ana Karen Téllez Alcaide

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación Biomédica de la Fundación
Hospital Nuestra Señora de la Luz, I.A.P. bajo la tutoría del Dr. Héctor Javier Pérez

Cano

Índice

Tabla de Abreviaturas	1
INTRODUCCIÓN	2
1. Los párpados.....	2
2. Blefaritis.....	4
3. Inmunidad Innata y Adaptativa	9
4. Receptores Tipo Toll (TLRs)	11
5. Caracterización del gen TLR9.....	19
Hipótesis.....	26
Justificación	26
Objetivo General	26
Objetivos particulares	27
Material y Métodos.....	27
1. Extracción de ADN.....	28
2. Reacción en Cadena de la Polimerasa para TLR9.....	29
3. Electroforesis.....	29
4. Secuenciación.....	30
5. Análisis estadístico	31
Resultados	31
Discusión	38
Conclusiones.....	40
Glosario	40
Referencias.....	45
Anexo A	57

Tabla de Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CpG	Citosina-fosfato-Guanina (Secuencias no metiladas de ADN bacteriano)
DGM	Disfunción de las glándulas de Meibomio
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
IFN	Interferón
IgM	Inmunoglobulina M
IL-1R	Receptor de la interleucina 1
LES	Lupus eritematoso sistémico
LRR	Repetición rica en leucina
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MBD	Proteína de unión a ADN metilado
MyD88	Factor de diferenciación mieloide 88
NF-KB	Factor de transcripción nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B activadas
NK	Natural killer
PAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PBC	Cirrosis biliar primaria
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones moleculares
rpm	Revoluciones por minuto
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
TLRs	Receptores tipo toll
Toll-IL-1R	Dominio TIR, dominio similar al receptor de interleucina 1
VPH	Virus del papiloma humano

INTRODUCCIÓN

1. Los párpados

Los párpados son estructuras móviles que cubren los ojos y tienen una función importante en la protección y la humectación del mismo mediante las secreciones lagrimales. Por otra parte, el reflejo del parpadeo protege al ojo de cuerpos extraños. Están compuestos por la conjuntiva palpebral, que reviste la superficie posterior de los párpados, el tarso, es una lámina fibrosa que le da cierta rigidez; el musculo orbital, que le da su movilidad; y la piel exterior [1,2].

En el interior del tarso se encuentran las glándulas de Meibomio, que son las responsables de la secreción del componente graso de la lágrima, están ubicadas en el tarso palpebral, perpendicularmente al borde palpebral [3-5], son glándulas de tipo sebáceo, que generan mediante un mecanismo de secreción holocrina, un conjunto de lípidos tensoactivos. Su función principal es recubrir la capa acuosa de la película lagrimal, evitando la evaporación [2].

En el párpado también se encuentran algunas otras glándulas de Zeiss que son sebáceas y glándulas de Moll que son sudoríparas, entre la conjuntiva y el tarso se encuentran las glándulas lagrimales de Krause y Wolfring (Figura 1) [2].

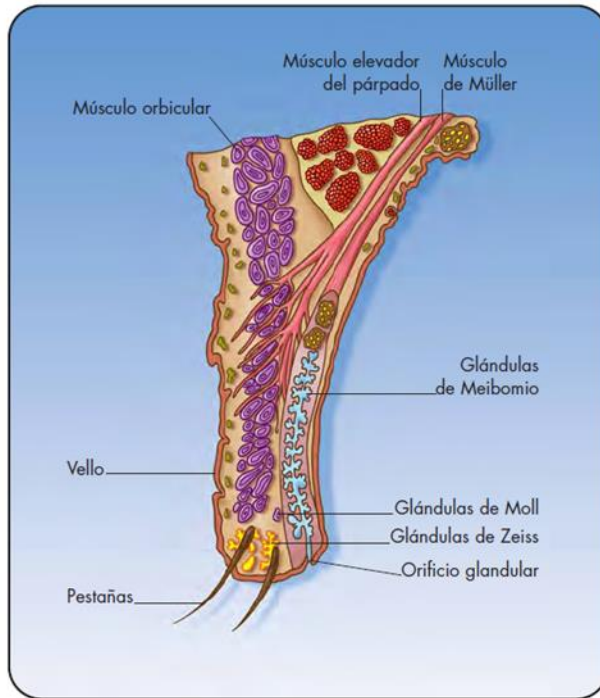


Figura1— Corte sagital del párpado. Tomado de *Superficie ocular, 2008, Vol. 2, No 2, pp. 4*

Al presentar una excesiva evaporación, provoca una deficiencia en la capa lipídica que es una de las causas más frecuentes y la etiología más diagnosticada de “ojo seco”. Sin embargo, con frecuencia, las secreciones excesivas de la glándula lagrimal, que originan el lagrimeo, son una compensación por la sequedad ocular, un efecto tóxico directo de la disfunción meibomiana es sobre la superficie ocular ya que existe una disfunción de la capa lipídica retrasando la salida de las lágrimas y una posterior concentración de residuos que producen un efecto irritante con síntomas de quemazón [6].

Por lo tanto, los párpados están expuestos a diversas enfermedades como la blefaritis, que es un término para la inflamación del párpado. Generalmente se refiere a los diferentes tipos de inflamación y la participación de las glándulas

Meibomianas, pestañas y piel. Es una afección muy común en la práctica oftalmológica [7].

2. Blefaritis

La blefaritis es un proceso inflamatorio agudo o crónico que tiene lugar en los párpados, principalmente en el borde libre palpebral, que generalmente evoluciona por crisis de exacerbaciones y remisiones y es frecuentemente bilateral (puede presentarse en ambos párpados) [8]. Abarca una gran variedad de entidades que se tienen que identificar antes de dar el tratamiento terapéutico, asimismo existen varias patologías asociadas, como la disfunción de la película lagrimal, infecciones virales, dermatitis seborreica alérgica, conjuntivitis o queratitis [1,6,9], por ello su etiología es multifactorial y con amplia variabilidad en los signos y síntomas [7]. Caracterizada por una relación entre la disfunción de glándula de meibomio y la flora ocular, principalmente por secreciones con desnaturalización del lípido meibomiano, y por un espesamiento de las mismas, que obstruyen los orificios de las glándulas de Meibomio, que puede dar lugar a una posible sobreinfección en el borde palpebral generando signos de inflamación crónica en párpados, así como cambios corneales y conjuntivales y en casos más graves a lesiones palpebrales como orzuelos y chalazión [8-10]. Esta patología fue descrita en 1908 por Elsching, siendo una de las condiciones más frecuentes por las cuales un paciente busca atención médica [9], los reportes muestran que la blefaritis representa un 37 a 47% de la consulta oftalmológica y un factor de predisposición es la edad del paciente [11]. Sin embargo, es una condición médica crónica común en todo el mundo [9].

En México se realizó un estudio epidemiológico en el año 2013, se encontró que los agentes microbiológicos más habituales en los pacientes con Blefaritis fueron las bacterias con un 40% seguida de *Demodex folliculorum* con un 8%. También se observó que existía una coinfección bacteria-Demodex, Bacteria-hongo, Hongo-Demodex y Bacteria-Hongo-Demodex en un total del 33% de casos [12].

2.1 Clasificación de Blefaritis

La blefaritis ha sido difícil de clasificar, ya que consiste en una gran variedad de entidades clínicas, los cuales manifiestan diferentes signos y síntomas, No existe un sistema de clasificación único aceptado para las diversas presentaciones de blefaritis [9] con el tiempo se ha propuesto esquemas de clasificación para los diferentes tipos de Blefaritis. Uno de los primeros fue establecido en 1946 por Thygeson que divide la blefaritis en tres tipos etiológicos basados en características clínicas distintivas: estafilococcica, seborreica y diplobacilaria [13]. Posteriormente McCauley y colaboradores introdujeron un esquema de clasificación basado en las características de la base de los párpados, pestañas, folículos pilosos, orificios de las glándulas de Meibomio, y cambios corneales. En la clasificación de McCulley, la blefaritis se subdivide en seis grupos: blefaritis estafilocócica, seborreica, seborreicas con estafilococos, seborreicas con seborrea meibomiana, seborreica con meibomitis secundaria y meibomitis primaria [6,9].

Históricamente, la blefaritis se ha dividido en Blefaritis anteriores (que afectan el borde del párpado anterior y pestañas) y Blefaritis posteriores (que afectan a las glándulas de Meibomio). Ambas formas pueden ser inflamatorias o infecciosas,

como se muestra en la **Tabla 1**. De forma alternativa, la blefaritis puede ser clasificada de acuerdo a los signos y síntomas que se presentan con mayor frecuencia, en estafilococos, seborreica, estafilococos y seborreica mixta, y la disfunción de las glándulas de Meibomio (DGM) [7].

Tabla 1— Clasificación etiológica de la Blefaritis. Tomado de *Can J Ophthalmol*, 2008, Vol. 43, No 2, pp171 [7]

Inflamatoria	Infecciosa
Seborreica	Bacteriana (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> y <i>Propionibacterium acnés</i>)
Disfunción de la Glándula de Meibomio	Viral (<i>Molluscum contagiosum</i> , <i>Herpes simplex</i> , <i>varicella-zoster</i>)
Alérgica (dermatitis atópica y de contacto)	Por Hongos (Poco común, pacientes inmunosuprimidos)
Asociación con Dermatitis (Rosacea)	Parasitaria (<i>Demodex folliculorum</i> , <i>Pediculosis pubis</i>)

Los organismos más frecuentemente aislados de pacientes con blefaritis crónica incluyen *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes*, *Corynebacterium sp*, y *Staphylococcus aureus* [10,14,15].

Groden y colaboradores analizaron pacientes diagnosticados con Blefaritis, en los que se lograron aislar a *Staphylococcus epidermidis* en mayor frecuencia que en el grupo control. Además, se encontró que los pacientes con blefaritis tienen mayor carga bacteriana que los pacientes control [14].

Asimismo McCulley y Dougherty aislaron con mayor frecuencia a *S. aureus* perteneciente al subgrupo de pacientes con blefaritis seborreica / estafilocócica que en los pacientes control [15].

Se ha encontrado que al hongo *Pityrosporum ovale* se asocia con mayor frecuencia con meibomitis en pacientes con blefaritis que en los controles, probablemente debido a secreciones abundantes que contienen ácidos grasos, que fomentan el crecimiento del hongo en el margen del párpado [16]. *Demodex folliculorum* se ha implicado en la rosácea y en la blefaritis, en exámenes microscópicos, se observó la presencia de este acaro en muestras de pestañas, se sugiere que pacientes que están infestados en las pestañas por Demodex, presentan con mayor frecuencia irritación ocular, inflamación de la conjuntiva, y queratitis [17]. Las formas más comunes de los principales subtipos de blefaritis se resumen en la **Tabla 2**. La inflamación del margen anterior es generalmente producida por estafilococos, seborreica o blefaritis mixta, mientras que la inflamación del borde posterior se asocia con MGD [10]. Además se debe buscar evidencias sobre afecciones dermatológicas ya que éstas se pueden presentar en asociación con la blefaritis. Algunas enfermedades dermatológicas pueden ser dermatitis seborreica, rosácea, y dermatitis atópica.

Tabla 2— Resumen de las presentaciones clínicas típicas de las formas más comunes de la blefaritis. Tomado de *Can J Ophthalmol*, 2008, Vol. 43, No 2, pp172 [7]

Presentación	Blefaritis Anterior (Estafilococcica)	Blefaritis Anterior (Seborreica)	Blefaritis Posterior (Disfunción de la glándula de Meibomio)
Demográficos	Predominantemente jóvenes, mujeres de mediana edad	Grupo de mayor edad, sin diferencia de género	—
Borde Parpebral	Collarettes (escamas duras) que se extienden desde la base y a lo largo de las pestañas	Escamas grasosas ("caspas") en bordes de los párpados y alrededor de las pestañas	Secreciones lipídicas espesas (puede ser espumosa)
Ulceraciones del Párpado	en la base de las pestañas	—	—
Cicatrización del Párpado	Puede ocurrir	—	Común en enfermedad de larga duración
Ausencia y / o rotura de pestañas	Frecuente	Rara	Inusual
Desorientación de Pestañas	Frecuente	Rara	Puede ocurrir con enfermedad de larga duración
Chalazión	Rara	Rara	Ocasional a frecuentar (puede ser múltiple)
Orzuelo	Puede ocurrir	—	—
Conjuntiva	Irritación de leve a moderada	Irritación leve	Irritación de leve a moderada con reacción papilar en la conjuntiva tarsal
Lagrime acuosa deficiente	Frecuentemente (50% tiene queratoconjuntivitis seca)	Frecuentemente (25%-40% Tienen ojo seco)	Frecuentemente (50% con rosácea ocular tienen ojo seco)
Cornea	Erosiones punteadas en epitelio inferior, cicatrización, neovascularización de infiltrados marginales, pannus,	Por lo general no se ve afectado	Erosiones epiteliales punteadas, infiltrados marginales, neovascularización panus, cicatrización
Asociado a desorden dermatológico	El eccema atópico (poco frecuente)	Dermatitis Seborreica	Rosácea

Debido a que la blefaritis es una enfermedad crónica e inflamatoria que puede ser causada por diferentes microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium spp*, *Propionibacterium spp*, levaduras como *Malassezia spp* y ácaros parásitos como los del género *Demodex* [10,15]. Es importante considerar las funciones principales del sistema inmunológico en el curso de la enfermedad, dado a que estamos constantemente expuestos a un espectro amplio de agentes

patógenos, con una gran variedad de formas, tamaños, composición y agresividad. Sin embargo, desarrollamos mecanismos de defensa contra este gran repertorio de patógenos, y nos permite responder apropiadamente para controlar la infección gracias al sistema inmunológico[18].

3. Inmunidad Innata y Adaptativa

El sistema inmunológico ha evolucionado para proteger al huésped de un universo de microorganismos patógenos que están en constante evolución, tiene la capacidad para generar una respuesta contra un patógeno invasor, toxina, o alérgeno y distingue entre lo propio de lo no propio. El sistema inmunitario utiliza ambos mecanismos innatos y adaptativos para detectar y eliminar los microorganismos patógenos [18,19].

En una respuesta inmunitaria innata, se encuentran los procesos antimicrobianos relativamente inespecíficos, ya que no son afectados intrínsecamente por el contacto previo con el agente infeccioso. Constituye la primera línea de defensa, está presente en todos los seres vivos, es una respuesta rápida pero carece de memoria inmunológica, no identifica características moleculares específicas, utiliza siempre receptores idénticos que reconocen moléculas comunes a grupos de patógenos, esta respuesta es mediada por los genes que se mantienen en la línea germinal que codifican proteínas que reconocen estos patrones estructurales conservados en los microorganismos [18,20-22].

La detección tardía de patógenos contribuye a infecciones recurrentes y respuestas sistémicas exacerbada, pudiendo producir daño tisular, disfunción de órganos y la muerte [19].

Sin embargo, la respuesta inmunitaria adaptativa, puede aumentar su eficacia y especificidad en forma notable [19]. Se presenta exclusivamente en vertebrados, tarda aproximadamente una semana en desarrollarse y es la responsable de la memoria inmunológica, es específica, ya que es capaz de identificar antígenos similares que portan una gran variedad de agentes patógenos discriminando entre lo propio y lo extraño y es mediada por linfocitos B y T [21,23,24].

Por otro lado, el concepto de la subdivisión de la respuesta inmunitaria en adaptativa e innata, está enfrentando un cambio. La activación de la respuesta inmunitaria innata es un prerrequisito para que se inicie la respuesta inmunitaria adaptativa [20]. El proceso de invasión por los patógenos, es detenido por el sistema inmunológico, gracias a sus mecanismos innatos y adquiridos. El reconocimiento de los microorganismos patógenos es el evento crucial para la activación del sistema inmunológico y la posterior eliminación del microorganismo [20,21].

Este reconocimiento esta generado por las células de la respuesta inmune innata donde participa un grupo de moléculas llamados receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRRs). Dentro de este grupo de PRRs se incluyen los receptores Tipo Toll o TLRs, los receptores Lectina Tipo C o CLR, receptor ácido retinoico inducible del gene 1 (RIG-1) y receptores tipo Nod o NLR. Estos receptores identifican los Patrones Moleculares Asociados a Patógenos o PAMPs, que son esenciales para la supervivencia y grado de patogenicidad del microorganismo, por lo que tienen una tasa de mutación mínima. Los PAMPs son moléculas

conservadas, capaces de inducir respuesta del sistema inmunológico innato [25-27]. La activación de los receptores de la inmunidad innata da lugar a una respuesta inmediata, poniendo en marcha distintas funciones celulares con capacidad de lisar algunos microorganismos, como son la fagocitosis y la secreción de gránulos intracelulares, citocinas, enzimas, moléculas de adhesión, defensinas y otros péptidos antimicrobianos, complemento, opsoninas, así como receptores de transducción de señales y numerosos mediadores intracelulares. En un proceso infeccioso no tiene lugar la activación de una única vía de señalización, sino que se activan simultáneamente varias vías que son necesarias para una respuesta celular adecuada [18-25,27,28].

4. Receptores Tipo Toll (TLRs)

Los receptores tipo Toll (TLRs) son el equivalente en mamíferos de los receptores Toll, que fueron caracterizados en *Drosophila melanogaster* por Medzhitov y cols en 1997 [23] y participan durante la embriogénesis de la mosca en el establecimiento de su eje dorso-ventral, pero más tarde se descubrió que la proteína Toll también intervenía en la respuesta antimicrobiana [23,29,30]. Estos receptores están involucrados en la respuesta inmunitaria innata en humanos y son claves en la activación y regulación de la respuesta inmunitaria [25]. Los TLRs tienen un papel crucial defendiendo al organismo contra patógenos a través de la inducción de citocinas inflamatorias e interferones de tipo I pertenecientes a la inmunidad innata y también son requeridos para el desarrollo de la respuesta inmunitaria adaptativa celular y humoral antígeno-específica [31,32]. Estos receptores son expresados en

una gran variedad de células del sistema inmunológico, tales como células dendríticas, macrófagos, neutrófilos y linfocitos, además de células endoteliales y epiteliales [33].

Estos receptores son divididos en dos grupos dependiendo de su localización celular. Un grupo está compuesto por TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10, TLR11, TLR12 y TLR13, que son expresados en la superficie celular y reconocen PAMPs membranales como lípidos, lipoproteínas y proteínas. El otro grupo está compuesto por TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9, los cuales son expresados en vesículas intracelulares como el retículo endoplásmico, endosomas, lisosomas y endolisosomas, y reconocen ARN y ADN de cadena simple y de cadena doble [34-37]. El más reciente descubrimiento de un miembro de la familia TLR, es el TLR15, el cual ha sido asociado con el reconocimiento de algunos componentes de *Salmonella sp.*[37]

La familia de los receptores TLRs constituye uno de los grupos que están mejor caracterizados dentro de los PRR, los cuales reconocen diferentes PAMPs.

4.1 Estructura de los TLRs

Los TLR pertenecen al tipo I de glicoproteínas integrales de membrana, que se caracterizan por presentar un dominio extracelular rico en leucina (LRR), responsable de reconocer los PAMPs de bacterias, virus, parásitos y hongos [33,34], y presentan una estructura muy conservada entre insectos y humanos [20-22], un dominio transmembranal y un dominio intracelular, o citoplasmático, homólogo al receptor de la interleucina 1 (IL-1R) que posee una región conservada

de 200 aminoácidos denominado dominio similar al receptor de interleucina, conocido como dominio TIR (Toll-IL-1R). Este dominio TIR se asocia a proteínas adaptadoras con un elevado grado de homología como es la proteína MyD88.

4.2 Vía de Señalización de TLR's

La activación de la cascada de señalización de los TLR's se origina en el dominio TIR, el cual posee cuatro moléculas adaptadoras, (MyD88, TIRAP/MAL, TRIF, y TRAM). Estas moléculas están asociadas con las interacciones del dominio TIR, según el tipo de TLR se activan diferentes adaptadores, también existe la combinación de estas moléculas para la activación de la cascada de señalización [38]. El funcionamiento de estas rutas puede ser dependiente o independiente de la proteína adaptadora MyD88. La vía independiente, es empleada por TLR3 y TLR4, ambos receptores señalizan a través de la proteína TRIF (adaptador que contiene el dominio TIR e induce IFN- β) y sólo TLR4 ocupa a la proteína TRAM que es la molécula adaptadora relacionada a TRIF [25,38,39].

En ambos casos se activan señales de comunicación intracelular en la que participan el NF-KB (factor de transcripción nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B activadas) y la cascada de la MAPK (Proteincinasas activadas por mitógenos), que dan lugar a la expresión de citocinas proinflamatorias. (Figura 2) [25,40-42].

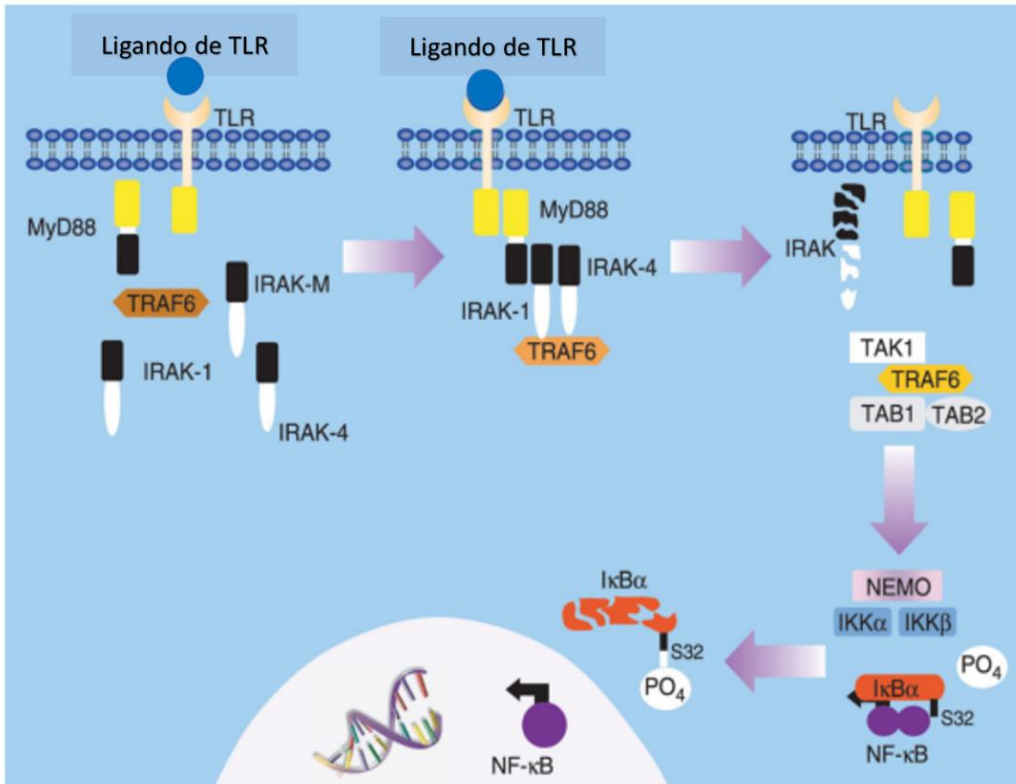


Figura 2 — Señalización del Receptor Tipo Toll. La unión del ligando al TLR conduce a su asociación con proteínas adaptadoras por dominios Toll-IL-1R (rectángulos amarillos). La unión de IRAK a los adaptadores está mediada a través de dominios de muerte (rectángulos negros). Esta vía conduce finalmente a la fosforilación y posterior degradación de IκB y la exposición del dominio de translocación nuclear de NFκ B. Este factor de transcripción a continuación se transloca al núcleo celular, donde activa la transcripción de genes proinflamatorios. TRAF, factor asociado al receptor TNF; TAB, TAK1, proteína de unión. *Tomado de Nature Immunology, 2004, Vol. 5, No. 2 pp 977, pp. 976 [26]*

4.3 Polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en TLRs

Estudios previos de algunas inmunodeficiencias primarias, asociadas con alteraciones en las vías de señalización mediadas por los TLR, demuestran que estas son críticas en la defensa contra la infección [43,44].

La susceptibilidad a las infecciones se manifiesta con herencia poligénica, donde se entrelazan factores ambientales y genéticos [45].

Se han identificado variantes genéticas conocidas como polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), que se producen en las diferentes poblaciones con apreciable frecuencia y que implican la sustitución de una base nitrogenada (1%), en los genes que codifican para los TLRs. Algunos estudios han empleado los SNP como genes candidatos para encontrar asociaciones con la susceptibilidad a diferentes enfermedades infecciosas [26,45,46].

Investigaciones recientes indican que algunos polimorfismos en genes de la respuesta inmunitaria innata están asociadas con desórdenes en la respuesta inflamatoria. Se cree que deficiencias a nivel de PRR afecta la maduración del sistema inmunológico e influyen en el riesgo de padecer una enfermedad.

El papel de los factores genéticos es determinante en la susceptibilidad a las infecciones y se ha hecho más evidente en la actualidad debido a que algunas personas parecen estar predispuestas a ciertas infecciones, mientras que otras están protegidas [19,47]. Por lo tanto, algunas personas pueden no responder adecuadamente a los ligandos del TLR debido a los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) dentro de los genes de estos receptores, lo que causa defectos

en transducción de señales intracelulares y da como resultado alteraciones en la susceptibilidad de las enfermedades (Figura 3).

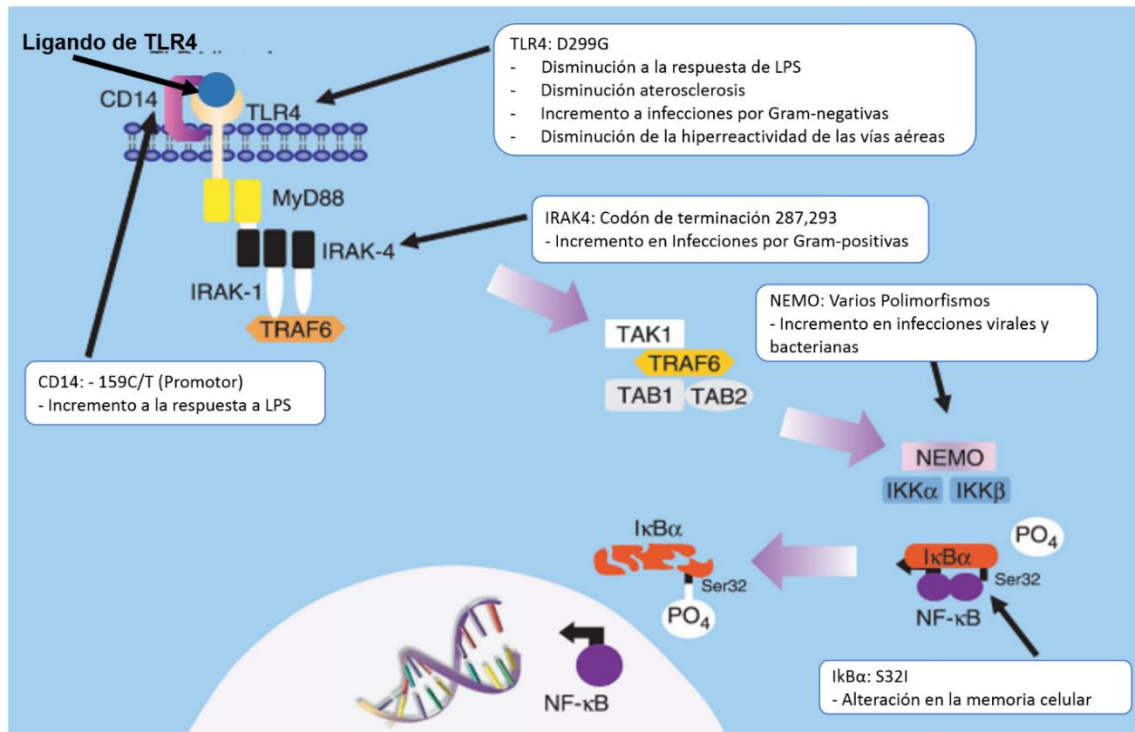


Figura 3 — Los polimorfismos en las moléculas de señalización TLR y su asociación con las enfermedades humanas. Esta es una vía de señalización de TLR simplificada, incluidos los productos de genes polimórficos asociados con diversas enfermedades humanas y sus fenotipos. *Tomado de Nature Immunology, 2004, Vol. 5, No. 2 pp. 977 [26]*

4.4 Enfermedades que se involucran a los TLRs y sus polimorfismos asociados

Los TLR regulan tanto la respuesta inmunitaria innata como adquirida, por lo que su función en el desarrollo de varias enfermedades ha sido arduamente investigada comparando la incidencia de la enfermedad entre personas con diferentes

polimorfismos en los genes que codifican para dichos receptores; estos estudios demuestran que la función de los TLR es importante en varias enfermedades, incluyendo la sepsis, inmunodeficiencias, aterosclerosis y artritis reumatoide [48-51].

El asma y la disminución en la sensibilidad de las vías aéreas al lipopolisacárido se asocian a un polimorfismo del TLR4. La sarcoidosis también se ha asociado a un polimorfismo en el TLR4 al igual que el rechazo a trasplantes alogénicos. Se ha encontrado sobreexpresión de TLR4 en placas aterosclerosas y en las células epiteliales de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. Los polimorfismos en TLR2 se han asociado con tuberculosis, neumonía, infecciones por estafilococo e inmunodeficiencia. El receptor TLR9 se ha asociado con el Lupus eritematoso sistémico (LES) [52-54], malaria [55-57], infección por Virus del papiloma humano (VPH) [58] y sepsis puerperal por estreptococo del grupo A [26,59]. La neumonía por *Legionella* se ha asociado con polimorfismos en TLR5, al igual que la esclerosis múltiple. La infección por virus sincicial respiratorio se asocia a sobre-presión de TLR3 en el epitelio de la mucosa bronquial. Los polimorfismos de TLR2 y TLR4 primordialmente también se han asociado con necrosis tubular aguda, psoriasis, malaria, artritis reumatoide, nacimiento pre término, fertilidad, angiogénesis de tumores, remodelación de los ventrículos cardíacos, isquemia cardíaca, enfermedad arterial de las coronarias, síndrome de estrés respiratorio (Tabla 3) [26,40,60].

Tabla 3— Enfermedades relacionadas con SNPs en TLRs. *Tomado de Current Genomics, 2012, Vol. 13, No. 8, pp. 635,636 [102]*

Gen	SNP	Enfermedad	Asociación encontrada	Asociación no encontrada
TLR1	-7202G/A	Sepsis	[61]	
	Asn248Ser	Lepra	[62]	
	Ile602Ser	Lepra	[63]	
		Candidemia	[64]	
TLR2	Arg677Trp	Lepra	[65]	
	Arg753Gln	Tuberculosis	[66]	
		Enfermedad del Lyme	[67]	
		Infección del tracto urinario	[68]	
		Infección Estafilocócica	[41]	[69]
TLR3	Asn284Ile	Ninguno		
	Tyr307Asp	Ninguno		
	Leu412Phe	Cáncer Colon rectal	[70]	
		Degeneración macular	[71]	
		Infección de HVI	[72]	
	Pro554Ser	Encefalitis por Herpes simple	[73]	
	Ser737Thr	Ninguno		
TLR4	Asp299Gly	Aterosclerosis	[74]	[75]
		Infección	[76]	[77]
		Enfermedad de Crohn	[78]	[79]
		Asma		[80]
	Thr399Ile	Aterosclerosis	[74]	[75]
		Infección	[76]	
		Enfermedad de Crohn		[79]
TLR5	Arg392Stop	Neumonía	[81]	
		Lupus eritematoso sistémico	[82]	[83]
TLR6	Ser249Pro	Asma	[84]	[85]
		Aspergilosis	[86]	
		Adelgazamiento de la pared del ventrículo izquierdo	[87]	
		Hepatitis C	[88]	

TLR7	Gln11Leu	Infección por VIH	[89]	
		Lupus eritematoso sistémico	[90]	[91]
	1-120T/G	Hepatitis C	[92]	
TLR8	Met1 Val, -129G/C	Fiebre hemorrágica del Congo	[93]	
		Tuberculosis	[94]	
		Aterosclerosis		[95]
TLR9	Pro99Leu	Ninguno		
	-1237T/C	Linfoma de Hodgkins	[96]	
		Malaria cerebral	[97]	
	+1174G/A	Nefritis Lúpica	[98]	
	+2848G/A	Cáncer Cervical	[99]	
-1486 C	Carcinoma Nasofaríngeo Nefritis Lupicia	[54,100]		
TLR10	Pro344Pro	Asma	[101]	
	Iso775Val	Asma	[101]	
TLR11	No se ha reportado ninguno			

5. Caracterización del gen TLR9

El gen que codifica para el receptor TLR9 se encuentra en el cromosoma 3p21.3. Se extiende por aproximadamente 5 kb y contiene dos exones, el segundo de los cuales es la región de mayor codificación [103]. Se han reportado SNPs en este gen, los cuales han sido tema de estudio para su asociación con enfermedades del sistema inmunológico [104].

5.1 Descripción del Receptor TLR9

La proteína codificada por este gen es un miembro de la familia de receptores Toll-like (TLR), que desempeña un papel fundamental en el reconocimiento de patógenos y la activación de la inmunidad innata [105]. TLR9 es un receptor endosómico, localizado en un compartimiento intracelular que reconoce motivos no metilados de ácido nucleico, especialmente Citosina-fosfato-Guanina (CpG), en ADN bacteriano [106,107], de igual forma reconoce ARN de cadena simple y doble por lo cual es importante para la defensa contra los virus [54].

TLR9 reconoce específicamente secuencias de ADN CpG que no está metilado y es monocatenario (ss). La metilación de la citosina en el motivo CpG reduce fuertemente la afinidad de TLR9 [3,4]. La secuencia CpG que se encuentra en la doble cadena de ADN es un estimulador débil de TLR9 en comparación con ADN CpG monocatenario [3]. La acumulación de ADN CpG y TLR9 en los endosomas conduce a su co-localización dentro de las mismas vesículas [104,108], e induce el reclutamiento de MyD88 para iniciar la señalización [2], lo cual conduce a la producción de interferón tipo I (IFN), principalmente citocinas que median la respuesta antiviral e IL-12 [109]. Un dominio de unión a la secuencia del ADN CpG

se identificó dentro de la secuencia de TLR9 que comparte homología con el dominio de unión de ADN-CpG-metilado de las proteínas MBD, una familia de proteínas que median la interacción entre el ADN metilado y están implicadas en el silenciamiento de genes y la remodelación de la cromatina [110].

La proteína TLR9 de humano contiene 1 032 aminoácidos y tiene una identidad del 75,5% con el TLR9 de *Mus musculus*. El TLR9, así como las otras proteínas del tipo TLR, contiene repeticiones extracelulares ricas en leucinas (LRRs) y un dominio toll / interleucina-1R citoplásmico. Además, tiene un péptido señal de 1-25 residuos y un dominio transmembrana de 819-836 residuos [104].

5.2 Expresión del Receptor TLR9

Este gen se expresa preferentemente en tejidos tales como el bazo, ganglios linfáticos, médula ósea y leucocitos de sangre periférica [105], por ejemplo en células dendríticas, linfocitos B, monocitos, y células natural killer (NK) [107,109].

5.3 SNP en el Receptor TLR9

Veinte SNPs se han descrito para el receptor TLR9, el gen -1486 T/C (rs187084) que pertenece a la región promotora en el intron 1, es uno de los SNP más importantes [104,107,109,111].

Los polimorfismos en el gen TLR9 han sido ampliamente estudiados por su asociación con la susceptibilidad o resistencia a muchas infecciones y enfermedades [112-116]. Asimismo se ha confirmado la asociación entre el progreso y la gravedad de las enfermedades infecciosas con TLR9 [57,107,117].

Se han descubierto que los polimorfismos genéticos en TLR9 tienen asociaciones con asma, enfermedad inflamatoria intestinal, aterosclerosis, la enfermedad coronaria, la malaria [107] y LES [54]. En este último estudio se analizaron ratones deficientes del receptor TLR9, en donde encontró que no presentan actividad supresora en las células T reguladoras y en consecuencia exacerbaban la enfermedad en varios modelos murinos [54]. Por otro lado, también se asoció las variantes en TLR9 con la susceptibilidad a tuberculosis [118,119], ya que TLR9 es expresado intracelularmente por diferentes células del sistema inmunológico y tiene un papel clave en la activación del sistema inmunitario innato contra la infección por *Mycobacterium* [118], este receptor alerta al sistema inmunológico mediante la unión de motivos de ADN no metilados y secuencias CpG a través de células dendríticas para generar la inducción de IL-12 [120]. Además, el papel de los polimorfismos en TLR9 en otras enfermedades infecciosas, inflamación y cáncer ha sido de gran interés por muchos investigadores y se ha pensado que los polimorfismos en TLR9 pueden influir la expresión, función y el splicing del ARN [118,120].

Existen dos polimorfismos de este gen que se han reportado en los últimos años: rs5743836 (T-1237C) y rs352140 (G2848A). El polimorfismo G2848A (la cual es una sustitución sinónima) y el T-1237C (localizada en la región promotora del TLR9) tienen cuatro haplotipos presentes comúnmente en la población americana-europea [121].

Diferentes estudios reportan que estos polimorfismos están asociados a varias enfermedades como alergia [122,123], susceptibilidad a infecciones [124], asma [121,122,125], aterosclerosis [126], LES [127] y la enfermedad de Crohn [128]. Recientemente, el polimorfismo G2848A ha sido asociado a la retinocoroiditis toxoplásmica en una población de Brasil [129]

Lázaro *et al.* [121] investigaron la asociación de TLR9 SNPs T -1237C y G2848A con el infarto de miocardio, trombosis venosa profunda y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) [45,130].

El alelo C del SNP T-1237C se asoció con un mayor riesgo de asma entre los estadounidenses de origen europeo, aunque este hallazgo fue poco significativo. Sin embargo, Noguchi *et al* [122] fueron incapaces de hallar una asociación entre este SNP y el asma en un estudio japonés. En dos estudios más no se encontró asociación del SNP en TLR9 con asma o con reestenosis coronaria [123,126].

Tao *et al.*, investigaron en el gen TLR9 el SNP 1174 G/A que se encuentra en la región intrónica y el SNP -1486 T/C que pertenece a la región promotora de este receptor, los pacientes con LES al ser comparados con el grupo control, el alelo

1174G fue más frecuente en los pacientes con lupus. Por otro lado, existen estudios en los que no se encuentra una asociación, ya sea en una o en ambas de estas variantes en gen TLR9, y la susceptibilidad a LES en pacientes procedentes de Corea, China y el Reino Unido, respectivamente [45,52,127].

Torok *et al.* [128] informó que el polimorfismo -1237C se asoció con la enfermedad de Crohn pero no encontraron asociación con la colitis ulcerosas, sin embargo en otro estudio no hubo una asociación con la enfermedad de Crohn, donde se analizó 174 pacientes alemanes con la enfermedad de Crohn, 138 pacientes con colitis ulcerosa y 265 donantes de sangre sanos. Lammers *et al.*, [131] también reportaron que el SNP de TLR9 en el alelo -1237C fue más frecuente en pacientes italianos con tres o más episodios de pouchitis en comparación con los pacientes con un menor número de episodios. Kikuchi *et al* [132] investigaron 90 pacientes italianos con cirrosis biliar primaria (PBC) y 90 controles y no encontraron asociación con este alelo y la PBC. Sin embargo, las pacientes con el gen 2848AA diagnosticados con PBC, al ser estimulados con motivos de ADN CpG tenían niveles más altos de expresión TLR9 y mayores niveles de IgM intracelular en comparación con las células B de pacientes con el gen 2848GG (Figura 4) [45,132].

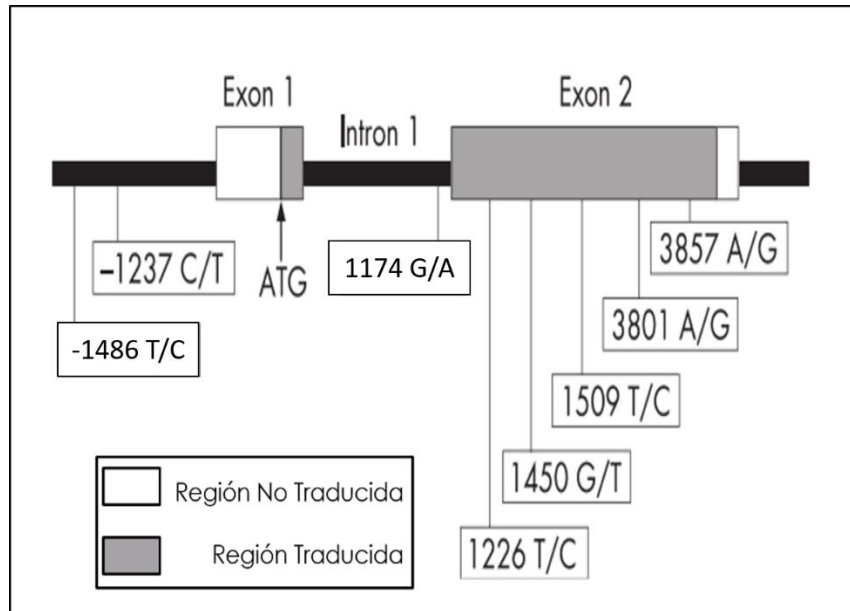


Figura 4 — Posición de SNPs en el gen TLR9 humano. Cuadros blancos indican las regiones no traducidas y cuadros grises las regiones traducidas del exón. Codón de inicio ATG TLR9 como posición 1, basado en GenBank Accession No NM_017442 [116].

El análisis de los polimorfismos genéticos permite identificar genes que confieren susceptibilidad a presentar enfermedades. Los polimorfismos son la base de la evolución y los que se consolidan bien pueden proporcionar ventajas a los individuos, sin embargo también pueden contribuir a causar enfermedades. Se conocen muchas enfermedades determinadas genéticamente y asociadas a SNPs en TLRs. En este estudio nos propusimos estudiar el SNP de la región promotora y la región +1174 G/A del receptor TLR9 debido a que están asociados con enfermedades infecciosas, sin embargo, no existen estudios que relacionen estos polimorfismos con el riesgo de adquirir la blefaritis infecciosa.

Hipótesis

Los TLR's juegan un papel determinante en la patogénesis de enfermedades infecciosas. Por lo tanto se espera que los polimorfismos -1486 T/C y +1174 G/A del gen TLR9 contribuyan a la susceptibilidad a desarrollar blefaritis infecciosa.

Justificación

Los SNPs no alteran el fenotipo de un individuo pero en determinadas condiciones ambientales pueden afectar a la función génica determinando la susceptibilidad de padecer una enfermedad o la respuesta a un tratamiento farmacológico, por lo tanto, sería posible determinar si los polimorfismos -1486 T/C y 1174 G/A del gen TLR9, se asocian con Blefaritis Infecciosa. Ya que es un problema de salud pública muy frecuente y es necesario conocer los aspectos moleculares que están relacionados a esta enfermedad para pronosticar su comportamiento en una población.

Objetivo General

Evaluar la relación que pueda existir entre los polimorfismo -1486T/C y 1174 G/A del gen TLR 9 y la blefaritis infecciosa

Objetivos particulares

- Obtener muestras por raspado palpebral de pacientes con diagnóstico clínico de blefaritis infecciosa y de sujetos sin infección ocular.
- Realizar la extracción de ADN de las muestras obtenidas.
- Realizar pruebas de PCR con oligonucleótidos específicos para bacterias Gram positivas y Gram negativas para comprobar el diagnóstico de infección en las muestras de pacientes.
- Establecer las condiciones para la PCR en la región promotora del gen y la región +1174 G/A del gen TLR9.
- Obtener la secuenciación de los productos de PCR y comparar la frecuencia alélica entre pacientes y controles
- Determinar si existe relación entre la frecuencia alélica entre pacientes y controles y calcular el riesgo relativo

Material y Métodos

Previo consentimiento informado (Anexo A) se obtuvo una muestra por raspado palpebral utilizando un hisopo de rayón y colocándolo en 400mL de medio de transporte con antibióticos. Se estudiaron 30 muestras de pacientes con diagnóstico clínico por Blefaritis infecciosa, y 30 muestras de raspado palpebral de individuos de población abierta sin antecedentes de blefaritis y clínicamente sanos.

1. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó con el kit QIAamp mini kit® (Qiagen) siguiendo las indicaciones del proveedor.

A 200 µL de la muestra se le adicionaron 250 µL de la solución de lisis CLS. Las muestras fueron incubadas a 56°C / 60 min en presencia de 30 µL de proteinasa K (1mg/mL) y se agitaron en vórtex durante 10 min para digerir todas las proteínas restantes. Posteriormente se adicionaron 100 µL de la solución de precipitación para incubar en refrigeración durante 5 min. Las muestras fueron centrifugadas nuevamente y se decantaron en un nuevo tubo de micro centrifugación (Eppendorf) para hacer un lavado con 300 µL de isopropanol, se homogenizo invirtiéndolos 50 veces de manera suave, con una tercera centrifugación por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se realizó un segundo lavado con 300 µL etanol al 70%. Las muestras se dejaron concentrar a 35 °C / 12 h donde finalmente se agregaron 100 µL de solución de hidratación. El material genético fue almacenado a -20°C hasta su estudio. Cabe destacar que todo el material que se empleó para esta técnica era material nuevo, estéril y libre de DNAsas y RNAsas.

2. Reacción en Cadena de la Polimerasa para TLR9

Se realizó PCR en la posición -1486T/C y 1174 G/A del gen TLR 9, cada reacción fue hecha en un volumen total de 20 µL conteniendo 10 µL de la HotStarTaq Master MixPolimerase (QIAGEN Sciences, Maryland, USA), (con 2.5 U de Taq polimerasa, 1.5 nM de MgCl₂, 200 uM de cada dNTP, 1X del buffer de reacción) y 0.3 µL de los oligonucleótidos para el SNP-1486T/C F 5'-ACT TAC TAT GTG CTG GGC ACT G-3' y R 5'-CCT GCT TGC AGT TGA CTG TGT A-3' y el SNP +1174 G/A F: 5'-TTC TGC AGG TAG GGC TTG GAG-3' y R: 5'-GAC AAG GAA AGG CTG GTG ACA T-3'

Los productos de amplificación son de aproximadamente 350pb y 326pb para el polimorfismo -1486T/C y 1174 G/A, respectivamente. La amplificación fue realizada utilizando el programa Labnet international. Inc, software V3.3.4C Multigene y consistio en: 95°C/10 min, y 40 ciclos a 95°C/1 min, con una Tm de 58.2 °C/1 min para el SNP -1486T/C y 59.1°C para +1174 G/A seguida con una extensión a 72°C/10min. La reacción se realizó en un termociclador AXYGEN MAXYGENE PCR System 2400 (Perkin Elmer Co, Norwalk, Connecticut)

3. Electroforesis

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, los cuales se corrieron a 90V durante 40 minutos y se usó como marcador de pesos moleculares el Track It™100 bp ADN Ladder (Invitrogen, L.T.). A las muestras se les añadió 2 µL de Gel RedNucleicAcidStain™ de Biotium y fueron observados bajo luz ultravioleta utilizando el transiluminador de UVP BioLite™ MultiSpectralSource con el programa Launch Vision Works LS.

Las bandas con el amplificado fueron cortadas para su posterior purificación utilizando los reactivos de QIAquick gel extraction kit.

Se colocó la banda a purificar en un tubo de micro centrifugación (Eppendorf) de 1.5 mL y se le adiciono 400µL del reactivo QG. Las muestras fueron incubadas a 56°C en baño María por 15min, mezclando en vórtex cada 3 min, se le adicionó 200 µL de isopropanol y se pasó a una Columna QIAquick con tubo colector, que posteriormente se centrifugaron a 1300 rpm/1min y se eliminó el sobrenadante para adicionar 500 µL del buffer QG, se centrifugaron las muestras a 1300 rpm/1 min, se descartó el sobrenadante y se lavó las muestras con 750 µL del amortiguador de PE , se centrifugo a 1300 rpm/1min dos veces descartando el sobrenadante para eliminar el amortiguador PE, se pasó la columna QIAquick a un tubo de micro centrifugación nuevo para la adición de 30µL H₂O, después de una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 1300 rpm/1min y el producto de amplificación obtenido se utilizó para la secuenciación nucleotídica.

4. Secuenciación

Se realizó secuenciación automatizada directa por el método de terminadores fluorescentes (Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) utilizando un programa de temperaturas que incluyen 25 ciclos de desnaturalización a 97°C por 30 segundos. Temperatura de alineamiento de 50°C por 15 segundos y temperatura de extensión de 60°C por 4 minutos. Los productos obtenidos se analizaron en un secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Las secuencias de ADN obtenidas por cada muestra, se compararon con la secuencia del gen TLR9 reportada en la base de datos www.ensembl.org/index.html

5. Análisis estadístico

Se realizó el conteo de los genotipos de ambos polimorfismos para cada individuo y con estos valores se procedió a calcular las frecuencias alélicas y genotípicas de pacientes y controles.

Las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas de los pacientes fueron comparadas con las frecuencia de los controles, obteniendo la relación estadística que existe entre un genotipo de referencia y los genotipos encontrados para cada polimorfismo utilizando la prueba exacta de Fisher. El software utilizado fue el GraphPad Prism V.6, a un nivel de significancia menor a 0.05, así mismo se determinó el riesgo relativo y la razón de momios.

Resultados

Se analizaron 30 muestras de pacientes con diagnóstico clínico por blefaritis infecciosa y 30 muestras de raspado palpebral de individuos de población abierta sin antecedentes de blefaritis y clínicamente sanos.

Se realizó la técnica de PCR para el gen TLR9 utilizando primers para amplificar la región 1174 G/A y -1486 T/C obteniendo el producto de amplificación esperado, 326 pb y 350 pb, respectivamente (Figura 5).

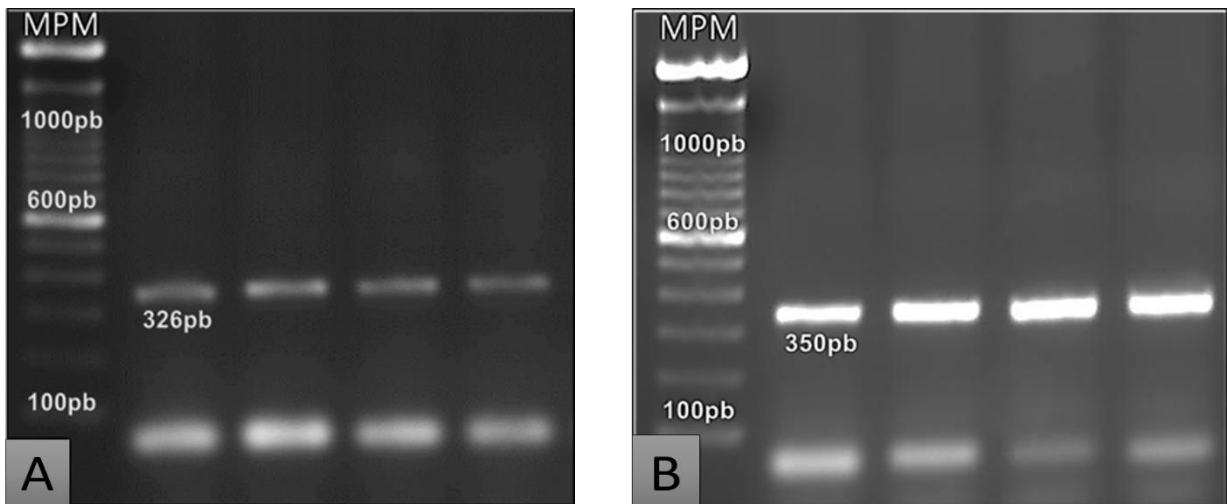
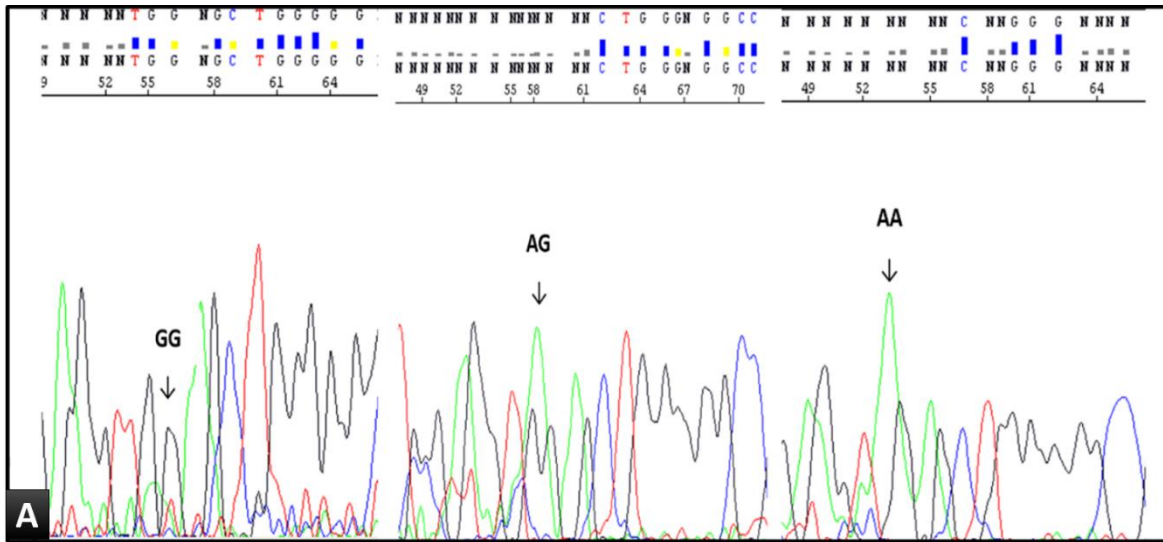


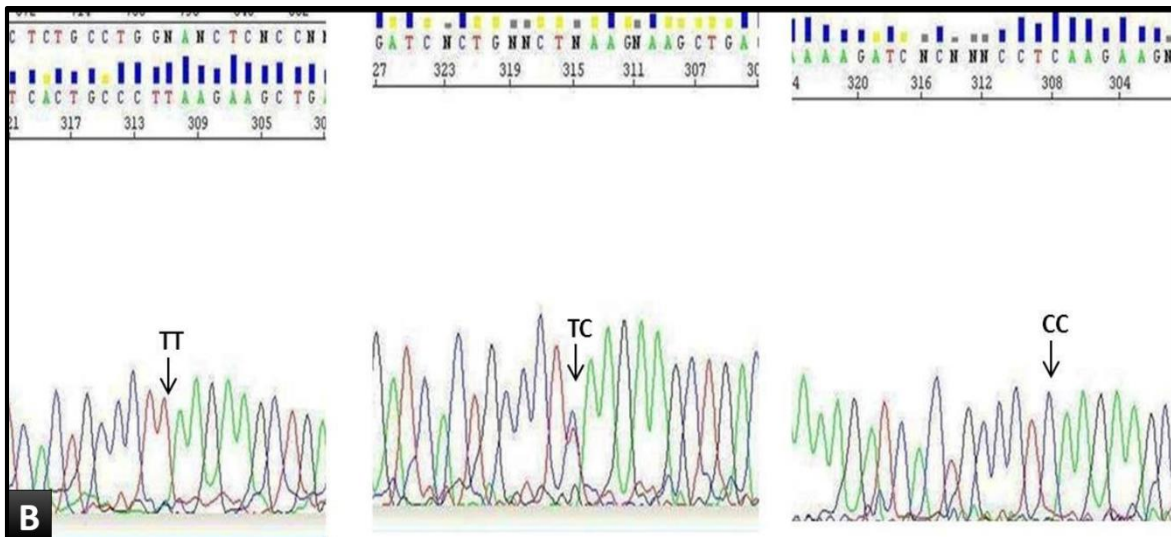
Figura 5—Fotografía que muestra el producto de amplificación en gel de agarosa de la región +1174G/A (**A**) y la región promotora de TLR9 (**B**). Tomada con el programa Launch Visión Works LS (transiluminador de UVP BioLite™ MultiSpectralSource)

Se llevó a cabo la secuenciación nucleotídica de la región +1174 G/A y de la región promotora del gen TLR9. Se analizaron los electroferogramas obtenidos y se

determinó la frecuencia alélica y genotípica observando específicamente la región 1174 G/A del gen TLR9 (Figura 5A) y -1486 T/C (Figura 5B). En la figura 6 se muestran los electroferogramas en el cuál cada pico representa una base nitrogenada, al presentar dos picos en una misma posición significa que el sujeto es heterocigoto para ese alelo.



Fotografía tomada del secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)



Fotografía tomada del secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

Figura 6— Electroferograma obtenidos de la secuenciación nucleotídica que muestra los diferentes polimorfismos (GG, AG y AA) del gen +1174 G/A **(A)** y los polimorfismos (TT, TC y CC) de la región promotora de TLR9 **(B)**. El código de colores es el siguiente: T = rojo, C = azul, A = Verde y G = negro

Con la frecuencia alélica y genotípica obtenidas, de los pacientes y controles, se compararon ambos grupos evaluando también la razón de momios (OR) y el riesgo relativo (RR) para cuantificar la magnitud de la asociación. Se encontró diferencia significativa en la región -1486 T/C resultando el alelo T un factor de riesgo para adquirir Blefaritis Infecciosa ($p < 0.0001$). Por otro lado, en la posición -1174 G/A no se observa una diferencia significativa. Los resultados se muestran en la tabla 4 y las figuras 7 y 8.

Tabla 4—Frecuencias alélicas y genotípicas de controles y pacientes en SNP de TLR9

SNP TLR9	Controles (n=%)	Blefaritis (n=%)	Valor P*	RR	OR (95% IC)
+1174 G/A (rs352139)					
AA	0 (0)	1(3.7)	-	-	
AG	23 (92)	25(92.6)	0.5306	1.920	2.765
GG	2(8)	1(3.7)	0.5000	-	5.000
Total	25	27			5.000
A	23(46)	27(50)	-	-	
G	27(54)	27(50)	0.42	1.087	1.174
-1486 T/C (rs187084)					
CC	15 (58.4)	5 (18.7)	-	-	
TC	8 (33.3)	10 (37.5)	0.0553	0.5111	0.2667
TT	2 (8.3)	12 (43.8)	0.0006	0.3333	0.05556
Total	25	27			
C	38(75)	20(37.5)	-	-	
T	12(25)	34(62.5)	<0.0001	2.143	5.383

Un valor $P \leq 0,05$ fue considerado significativo.

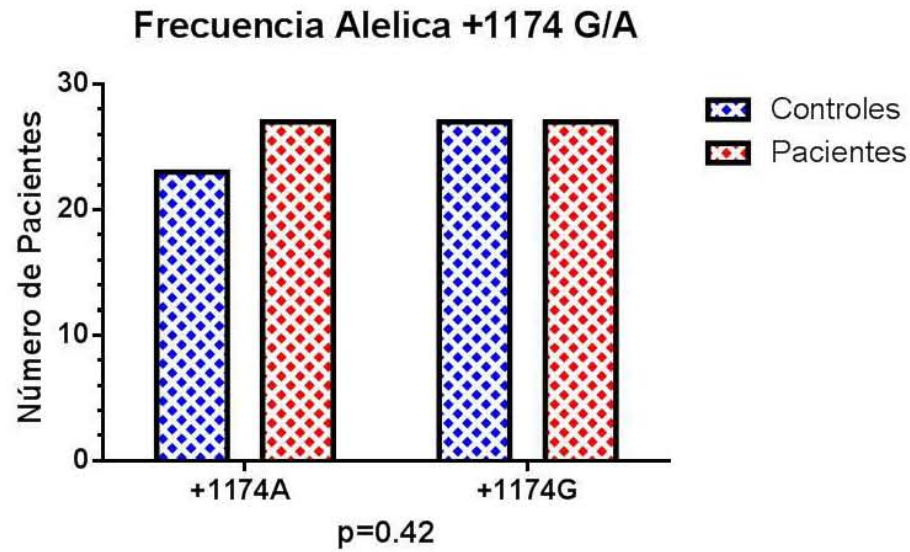
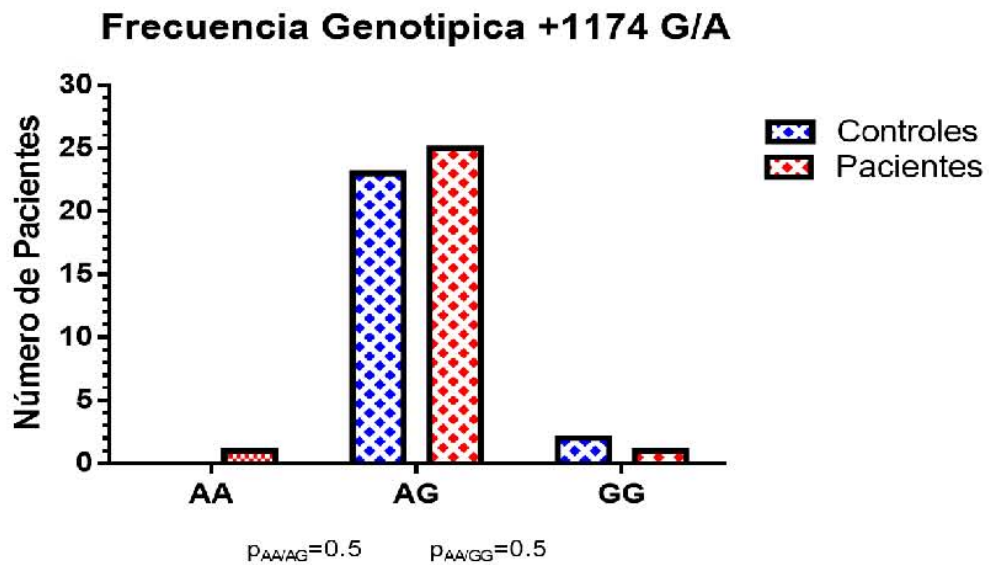
A**B**

Figura 7— A Frecuencia Alélica de la región +1174. No se observó diferencia significativa al comparar los grupos pacientes y controles. **B Frecuencia genotípica de la región +1174.** No se observaron diferencias significativas al comparar los genotipos. En la imagen se observa el mismo comportamiento para cada genotipo entre controles y pacientes.

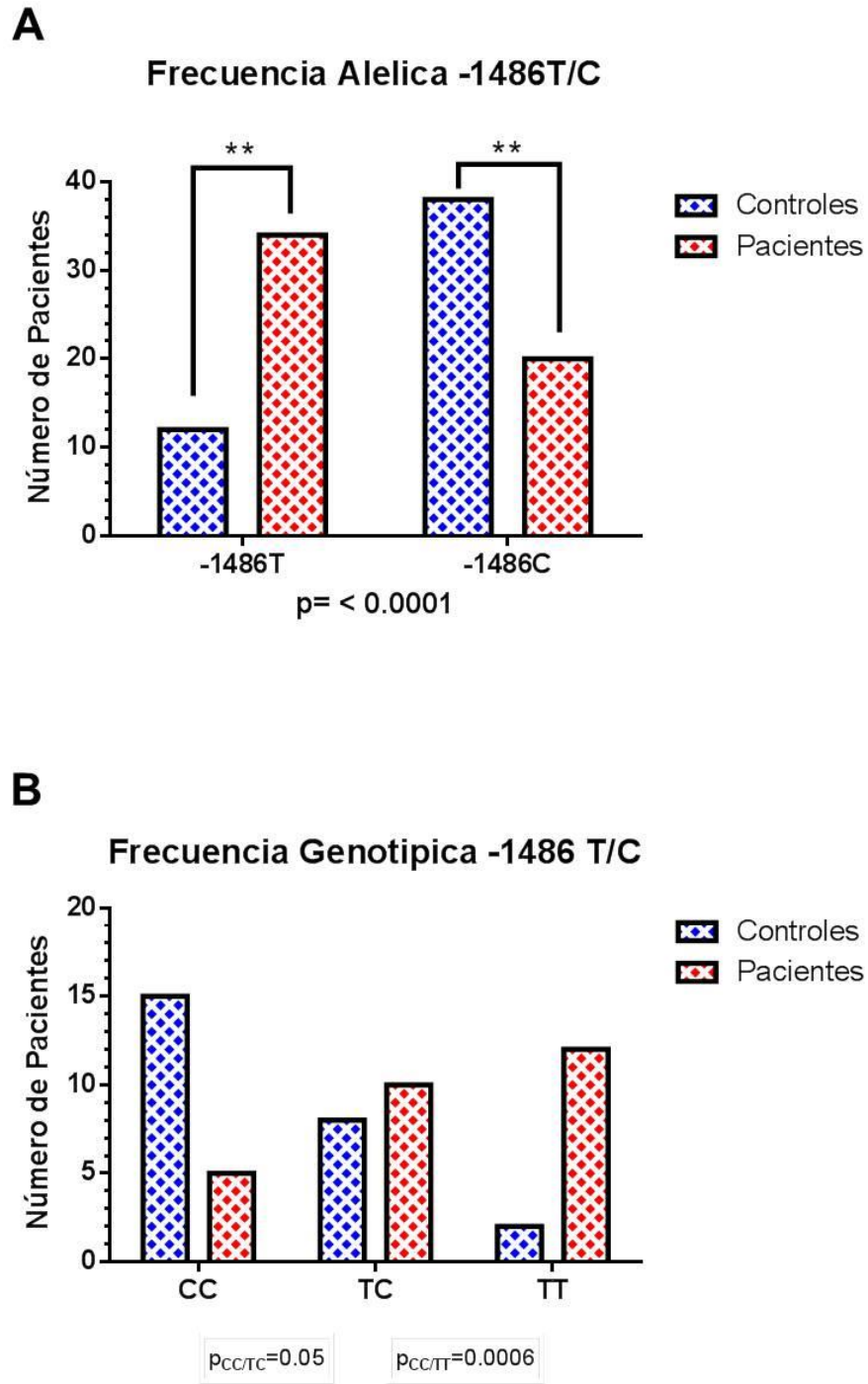


Figura 8— A. Frecuencia alélica de la región -1486 del gen TLR9. Se observa diferencia significativa al comparar los grupos, casos y controles, observando que el alelo T se encuentra en mayor frecuencia en pacientes. **B. Frecuencia Genotípica de la región -1486 del gen TLR9.** Se observa una mayor frecuencia del genotipo TT y TC en el grupo de blefaritis, esta diferencia fue estadísticamente significativa.

Discusión

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) de los genes Toll Like Receptors (TLRs) podrían afectar las respuestas inmunológicas que son de vital importancia para la defensa del huésped o patogénesis de la enfermedad inflamatoria. Con respecto a los SNPs de TLR9, el papel que desempeñan en el mecanismo de infección no son totalmente claros; sin embargo, Lazarus *et al* en 2003 y Cobán *et al* en 2005 demostraron que el SNP -1486T/C en la región promotora del gen TLR9 modifica la expresión y, por consiguiente, su función [55,121]. Además, varios investigadores han estudiado el papel de los polimorfismos genéticos de TLR9 en enfermedades infecciosas y en enfermedades sistémicas tales como Lupus eritematoso sistémico (LES) [54], diabetes mellitus tipo 2 [117] enfermedad de arteria coronaria [117] y malaria [107]. El análisis de los polimorfismos genéticos permite identificar genes que confieren susceptibilidad a presentar enfermedades tanto infecciosas como sistémicas. En este estudio, el análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo +1174G/A del gen TLR9 resultó similar entre los grupos de estudio, no encontrándose diferencia significativa entre ellos ($P=0.42$), este resultado sugiere que no hay asociación de este polimorfismo con la blefaritis infecciosa (RR=1.08 y OR=1.17).

Por otro lado, la secuenciación de la región promotora de TLR9, reveló la mayor frecuencia alélica en el alelo -1486T en pacientes con blefaritis con una diferencia significativa al ser comparadas con el grupo control obteniéndose un valor de p menor a 0.0001, un riesgo relativo de 2.14 y una razón de momios de 5.38. La frecuencia genotípica, de la región promotora del gen TLR9, se asoció con un

aumento significativo al presentar el alelo T como factor de riesgo, obteniendo una frecuencia mayor en pacientes con el genotipo TT. Por el contrario, se obtuvo una mayor frecuencia en controles con el genotipo CC. Estos resultados reflejan que el polimorfismo -1486T del gen TLR9 se encuentra asociado con el riesgo de infección mientras que, el alelo -1486C, presenta un papel protector.

Se han realizado estudios de los polimorfismos en el gen TLR9 en diferentes enfermedades como nefritis lúpica que en 2012 Ramachandran [54] *et al.* encontraron que los pacientes portadores del alelo -1486C tienen mayor riesgo de desarrollar la enfermedad. En un estudio más reciente, Dai y colaboradores encontraron que el alelo 1486C se relaciona con la susceptibilidad de carcinoma nasofaríngeo [100], sin embargo, en nuestro estudio se relaciona el 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.

Conclusiones

- No se encontraron resultados estadísticamente significativos en las frecuencias alélicas del polimorfismo +1174 G/A al ser comparados los pacientes con el grupo control, lo que sugiere que no existe una asociación con la blefaritis infecciosa.
- Se demostró una alta frecuencia del alelo T en los pacientes, lo que indica que el polimorfismo -1486T en la región promotora del gen TLR9 tiene asociación con la susceptibilidad a desarrollar blefaritis infecciosa en la población estudiada.
- Los resultados sugieren que el alelo -1486 T es un factor de riesgo a blefaritis infecciosa.

Glosario

Alelo: Cada una de las formas alternativas que puede tener un mismo gen, un individuo hereda dos alelos para cada gen, uno del padre y otro de la madre. Los alelos se encuentran en la misma posición dentro de los cromosomas homólogos.

Blefaritis: Proceso inflamatorio agudo o crónico que tiene lugar en los párpados, principalmente en su borde, causa irritación, comezón, enrojecimiento y escozor o ardor en los ojos, puede estar asociada con una infección ocular bacteriana, disfunción de la glándula de meibomio, síntomas de ojo seco o ciertos tipos de enfermedades de la piel como la rosácea.

Chalazión: Protuberancia pequeña en el párpado causada por una obstrucción de la glándula de meibomio, cuando una de estas glándulas se bloquea, los lípidos se acumula dentro de la glándula y forma un abultamiento en el párpado.

Frecuencia Alélica: Medida de la presencia de un alelo dado en una población, es la proporción de todos los alelos de ese gen en la población que corresponden específicamente a ese tipo.

Frecuencia Genotípica: Es la frecuencia o proporción de un genotipo dado en una población.

Gen: Unidad básica, tanto física como funcional, de la herencia, y transmite información de una generación a la siguiente, los genes están dispuestos, unos tras otros, en estructuras llamadas cromosomas.

Gen silvestre: Asociado al fenotipo normal, el más común en la población. Opuesto a alelo mutante.

Genotipo: Descripción del conjunto de genes que hereda un individuo de sus progenitores, el genotipo de un individuo permanece invariable a lo largo de su vida, con independencia del entorno que lo rodea y afecta.

Glándulas de Krause y Wolfring: Glándulas accesorias situadas en la conjuntiva del párpado superior, proporcionan el componente acuoso de la película lagrimal.

Glándulas de Meibomio: Glándulas que se encuentran situadas en los párpados superior e inferior y producen una secreción compuesta por diferentes sustancias, entre las que abundan diversos lípidos como fosfolípidos , triglicéridos y esteroides libres. Esta secreción forma parte de la película lagrimal y previene su evaporación.

Glándulas de Moll: Glándulas sudoríparas, son relativamente grandes y de forma tubular, estas glándulas vierten su contenido hacia las pestañas cercanas, segregan lípidos que se agregan a la capa superficial de las lágrimas, retardando la evaporación de la mismas.

Glándulas de Zeiss: Glándulas sebáceas que se encuentra localizada en el margen del párpado del ojo, segrega una sustancia aceitosa que se excreta a través de conductos excretorios del lóbulo sebáceo hacia la porción media del folículo piloso.

Heterocigoto: Con respecto a un gen específico, el organismo posee dos alelos diferentes de ese gen para un rasgo dado en los dos cromosomas homólogos (por ejemplo, un genotipo es Aa).

Homocigoto: Con respecto a un gen específico, el organismo posee dos copias idénticas de ese gen para un rasgo dado en los dos cromosomas homólogos (por ejemplo, un genotipo es aa o AA).

Orzuelo: Absceso pequeño (acumulación de pus) localizado superficialmente, de alguna glándulas de Zeiss o de glándulas de Moll en la base de las pestañas. La causa de este trastorno es una infección bacteriana producida comúnmente por el *Staphylococcus aureus*

Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMP): Patrón molecular común y constante de la superficie de los microorganismos, que son únicos en los microorganismos y son esenciales para su metabolismo y su supervivencia.

Población en genética: Grupo de individuos que comparten un acervo genético común y tienen la posibilidad de aparearse.

Polimorfismo: Coexistencia de dos o más fenotipos alternos en una misma población o entre poblaciones. Por lo general, los diversos fenotipos son originados por los alelos alternos de un gen.

Polimorfismo de un solo nucleótido (SNP): Variación de una base por otra en un lugar específico del genoma, se encuentra en más de un 1 % de la población. Son la forma más común de variación genética.

Razón de Momios: Medida estadística utilizada en estudios epidemiológicos transversales de casos y controles, es la posibilidad de que una condición de salud o enfermedad se presente en un grupo de población frente al riesgo de que ocurra en otro, suele realizarse entre grupos que presentan condiciones de vida similares, con la diferencia de que uno se encuentra expuesto a un factor de riesgo, mientras

que el otro carece de esta característica. Por lo tanto, la razón de momios o de posibilidades es una medida de tamaño de efecto.

Receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRRs): Receptores que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos, dentro de este grupo de PRRs se incluyen TLRs, CLR, RLR y NLR.

Receptores Tipo Toll (TLR): Llamados de esa manera por su similitud con el receptor Toll de la mosca de la fruta *Drosophila*, son un tipo de proteínas que se encuentran en las células del sistema inmunitario y que cumplen la función de receptores tipo 1, que reconocen PAMP's.

Riesgo Relativo: Cociente entre el riesgo en el grupo con el factor de exposición o factor de riesgo y el riesgo en el grupo de referencia (que no tiene el factor de exposición) como índice de asociación.

Secreción holocrina: Secreción en la cual la totalidad de la célula entra a formar parte de los productos secretados.

Splicing (corte y emplame): Proceso en el cual el ARNm eucariote se transcribe íntegramente del gen estructural como precursor del ARNm, donde finalmente se eliminan los intrones y los exones que los flanquean se unen para generar el ARNm maduro.

Susceptibilidad a enfermedad: Condición del cuerpo que aumenta la probabilidad de que el individuo desarrolle una enfermedad en particular. La susceptibilidad está influenciada por una combinación de factores genéticos y ambientales.

Referencias

1. Pflugfelder SC, Karpecki PM, Perez VL (2014) Treatment of blepharitis: recent clinical trials. *Ocul Surf* 12: 273-284.
2. McCulley JP, Shine WE (2002) Meibomian gland and tear film lipids: structure, function and control. *Adv Exp Med Biol* 506: 373-378.

3. McCulley JP (1984) Blepharoconjunctivitis. *Int Ophthalmol Clin* 24: 65-77.
4. McCulley JP, Sciallis GF (1977) Meibomian keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 84: 788-793.
5. Kanski JJ (2004) *Oftalmología Clínica*, Madrid (España).
6. McCulley JP, Dougherty JM, Deneau DG (1982) Classification of chronic blepharitis. *Ophthalmology* 89: 1173-1180.
7. Bruce Jackson W (2008) Blepharitis: current strategies for diagnosis and management. *Canadian Journal of Ophthalmology/Journal Canadien d'Ophtalmologie* 43: 170-179.
8. Norn MS (1982) Incidence of *Demodex folliculorum* on skin of lids and nose. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 60: 575-583.
9. McCulley JP, Shine WE (2000) Changing concepts in the diagnosis and management of blepharitis. *Cornea* 19: 650-658.
10. Dougherty JM, McCulley JP (1984) Comparative bacteriology of chronic blepharitis. *Br J Ophthalmol* 68: 524-528.
11. Millán Gámez YK, Reynoso Núñez B (2012) Diagnostico y tratamiendo de Blefaritis. *Catálogo maestro de guías de práctica clínica IMSS 529-12*: 36.
12. Chavez España Cecilia MCM, Moctezuma Baltazar (2013) Estudio Epidemiologico de la Blefaritis infecciosa en Poblacion Mexicana utilizando tecnicas de Biologia Molecular para la detección de patogenos. *TESIS*: 45-55.
13. Thygeson P (1946) Etiology and treatment of blepharitis; a study in military personnel. *Arch Ophthal* 36: 445-477.
14. Groden LR, Murphy B, Rodnite J, Genvert GI (1991) Lid flora in blepharitis. *Cornea* 10: 50-53.
15. McCulley JP, Dougherty JM (1986) Bacterial aspects of chronic blepharitis. *Trans Ophthalmol Soc U K* 105 (Pt 3): 314-318.
16. Seal DV, McGill JI, Jacobs P, Liakos GM, Goulding NJ (1985) Microbial and immunological investigations of chronic non-ulcerative blepharitis and meibomianitis. *Br J Ophthalmol* 69: 604-611.
17. Kheirkhah A, Casas V, Li W, Raju VK, Tseng SC (2007) Corneal manifestations of ocular demodex infestation. *Am J Ophthalmol* 143: 743-749.

18. Regueiro González JR, López Larrea C, González Rodríguez S, Martínez Naves E (2010) INMUNOLOGÍA. Biología y Patología del sistema inmunitario.
19. Hill AV (2001) The genomics and genetics of human infectious disease susceptibility. *Annual review of genomics and human genetics* 2: 373-400.
20. Takeda K, Akira S (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17: 1-14.
21. Werling D, Jungi TW (2003) TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol* 91: 1-12.
22. Takeuchi O, Akira S (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140: 805-820.
23. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394-397.
24. Medzhitov R (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1: 135-145.
25. Akira S (2003) Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 278: 38105-38108.
26. Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA (2004) Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol* 5: 975-979.
27. Sandor F, Buc M (2005) Toll-like receptors. I. Structure, function and their ligands. *Folia Biol (Praha)* 51: 148-157.
28. Cooke GS, Hill AV (2001) Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nat Rev Genet* 2: 967-977.
29. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF (1998) A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 588-593.
30. Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11: 373-384.
31. Kopp EB, Medzhitov R (1999) The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 11: 13-18.
32. Kumar H, Kawai T, Akira S (2009) Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 388: 621-625.
33. Akira S (2006) TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 311: 1-16.

34. Tesar BM, Goldstein DR (2007) Toll-like receptors and their role in transplantation. *Front Biosci* 12: 4221-4238.
35. Gay NJ, Gangloff M, Weber AN (2006) Toll-like receptors as molecular switches. *Nat Rev Immunol* 6: 693-698.
36. Kumar H, Kawai T, Akira S (2011) Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 30: 16-34.
37. Nerren JR, Swaggerty CL, MacKinnon KM, Genovese KJ, He H, et al. (2009) Differential mRNA expression of the avian-specific toll-like receptor 15 between heterophils from *Salmonella*-susceptible and -resistant chickens. *Immunogenetics* 61: 71-77.
38. Uematsu S, Akira S (2006) Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med (Berl)* 84: 712-725.
39. Li X, Qin J (2005) Modulation of Toll-interleukin 1 receptor mediated signaling. *J Mol Med (Berl)* 83: 258-266.
40. Texereau J, Chiche J-D, Taylor W, Choukroun G, Comba B, et al. (2005) The importance of Toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections. *Clinical infectious diseases* 41: S408-S415.
41. Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA (2000) A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infection and immunity* 68: 6398-6401.
42. Medzhitov R (2007) Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449: 819-826.
43. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, et al. (2003) Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301: 640-643.
44. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, et al. (2003) TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 4: 1144-1150.
45. Misch E, Hawn T (2008) Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease. *Clinical Science* 114: 347-360.
46. Casanova JL, Abel L (2002) Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol* 20: 581-620.

47. Cai Y, Peng YH, Tang Z, Guo XL, Qing YF, et al. (2014) Association of Toll-like receptor 2 polymorphisms with gout. *Biomedical reports* 2: 292-296.
48. Ameziane N, Beillat T, Verpillat P, Chollet-Martin S, Aumont MC, et al. (2003) Association of the Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with acute coronary events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: e61-64.
49. Hill AV (2006) Aspects of genetic susceptibility to human infectious diseases. *Annu Rev Genet* 40: 469-486.
50. Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA (2002) Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med* 162: 1028-1032.
51. Smirnova I, Mann N, Dols A, Derkx HH, Hibberd ML, et al. (2003) Assay of locus-specific genetic load implicates rare Toll-like receptor 4 mutations in meningococcal susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 6075-6080.
52. De Jager PL, Richardson A, Vyse TJ, Rioux JD (2006) Genetic variation in toll-like receptor 9 and susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 54: 1279-1282.
53. Ng MW, Lau CS, Chan TM, Wong WH, Lau YL (2005) Polymorphisms of the toll-like receptor 9 (TLR9) gene with systemic lupus erythematosus in Chinese. *Rheumatology (Oxford)* 44: 1456-1457.
54. Ramachandran R, Sharma V, Rathi M, Yadav AK, Sharma A, et al. (2012) Association between -1486 T>C and +1174 G>A single nucleotide polymorphisms in TLR9 gene and severity of lupus nephritis. *Indian J Nephrol* 22: 125-129.
55. Coban C, Ishii KJ, Kawai T, Hemmi H, Sato S, et al. (2005) Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med* 201: 19-25.
56. Hill AV (2001) The genomics and genetics of human infectious disease susceptibility. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2: 373-400.
57. Zakeri S, Pirahmadi S, Mehrizi AA, Djadid ND (2011) Genetic variation of TLR-4, TLR-9 and TIRAP genes in Iranian malaria patients. *Malar J* 10: 77.

58. Oliveira LB, Louvanto K, Ramanakumar AV, Franco EL, Villa LL, et al. (2013) Polymorphism in the promoter region of the Toll-like receptor 9 gene and cervical human papillomavirus infection. *J Gen Virol* 94: 1858-1864.
59. Schwartz DA, Cook DN (2005) Polymorphisms of the Toll-like receptors and human disease. *Clin Infect Dis* 41 Suppl 7: S403-407.
60. Rashkova M, Kirov A, Todorova A, Mitev V Toll-Like Receptor (TLR2 and TLR4) Polymorphisms: Markers of Innate Immunity in Oral Infection in Children.
61. Wurfel MM, Gordon AC, Holden TD, Radella F, Strout J, et al. (2008) Toll-like receptor 1 polymorphisms affect innate immune responses and outcomes in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 178: 710-720.
62. Schuring RP, Hamann L, Faber WR, Pahan D, Richardus JH, et al. (2009) Polymorphism N248S in the human Toll-like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. *J Infect Dis* 199: 1816-1819.
63. Johnson CM, Lyle EA, Omueti KO, Stepensky VA, Yegin O, et al. (2007) Cutting edge: A common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. *J Immunol* 178: 7520-7524.
64. Plantinga TS, Johnson MD, Scott WK, van de Vosse E, Velez Edwards DR, et al. (2012) Toll-like receptor 1 polymorphisms increase susceptibility to candidemia. *J Infect Dis* 205: 934-943.
65. Kang TJ, Lee SB, Chae GT (2002) A polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with IL-12 production from monocyte in lepromatous leprosy. *Cytokine* 20: 56-62.
66. Ogus AC, Yoldas B, Ozdemir T, Uguz A, Olcen S, et al. (2004) The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur Respir J* 23: 219-223.
67. Schroder NW, Diterich I, Zinke A, Eckert J, Draing C, et al. (2005) Heterozygous Arg753Gln polymorphism of human TLR-2 impairs immune activation by *Borrelia burgdorferi* and protects from late stage Lyme disease. *J Immunol* 175: 2534-2540.
68. Tabel Y, Berdeli A, Mir S (2007) Association of TLR2 gene Arg753Gln polymorphism with urinary tract infection in children. *Int J Immunogenet* 34: 399-405.

69. Moore CE, Segal S, Berendt AR, Hill AV, Day NP (2004) Lack of association between Toll-like receptor 2 polymorphisms and susceptibility to severe disease caused by *Staphylococcus aureus*. *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 1194-1197.
70. Castro FA, Forsti A, Buch S, Kalthoff H, Krauss C, et al. (2011) TLR-3 polymorphism is an independent prognostic marker for stage II colorectal cancer. *Eur J Cancer* 47: 1203-1210.
71. Zhou P, Fan L, Yu KD, Zhao MW, Li XX (2011) Toll-like receptor 3 C1234T may protect against geographic atrophy through decreased dsRNA binding capacity. *Faseb j* 25: 3489-3495.
72. Sironi M, Biasin M, Cagliani R, Forni D, De Luca M, et al. (2012) A common polymorphism in TLR3 confers natural resistance to HIV-1 infection. *J Immunol* 188: 818-823.
73. Zhang SY, Jouanguy E, Ugolini S, Smahi A, Elain G, et al. (2007) TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science* 317: 1522-1527.
74. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, et al. (2002) Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med* 347: 185-192.
75. Yang IA, Holloway JW, Ye S (2003) TLR4 Asp299Gly polymorphism is not associated with coronary artery stenosis. *Atherosclerosis* 170: 187-190.
76. Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, Coyle SM, Corbett SA, et al. (2002) Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis* 186: 1522-1525.
77. Feterowski C, Emmanuilidis K, Miethke T, Gerauer K, Rump M, et al. (2003) Effects of functional Toll-like receptor-4 mutations on the immune response to human and experimental sepsis. *Immunology* 109: 426-431.
78. Pierik M, De Hertogh G, Vermeire S, Van Assche G, Van Eyken P, et al. (2005) Epithelioid granulomas, pattern recognition receptors, and phenotypes of Crohn's disease. *Gut* 54: 223-227.
79. Hong J, Leung E, Fraser AG, Merriman TR, Vishnu P, et al. (2007) TLR2, TLR4 and TLR9 polymorphisms and Crohn's disease in a New Zealand Caucasian cohort. *J Gastroenterol Hepatol* 22: 1760-1766.

80. Yang IA, Barton SJ, Rorke S, Cakebread JA, Keith TP, et al. (2004) Toll-like receptor 4 polymorphism and severity of atopy in asthmatics. *Genes Immun* 5: 41-45.
81. Hawn TR, Verbon A, Lettinga KD, Zhao LP, Li SS, et al. (2003) A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J Exp Med* 198: 1563-1572.
82. Hawn TR, Wu H, Grossman JM, Hahn BH, Tsao BP, et al. (2005) A stop codon polymorphism of Toll-like receptor 5 is associated with resistance to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 10593-10597.
83. Demirci FY, Manzi S, Ramsey-Goldman R, Kenney M, Shaw PS, et al. (2007) Association study of Toll-like receptor 5 (TLR5) and Toll-like receptor 9 (TLR9) polymorphisms in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 34: 1708-1711.
84. Tantisira K, Klimecki WT, Lazarus R, Palmer LJ, Raby BA, et al. (2004) Toll-like receptor 6 gene (TLR6): single-nucleotide polymorphism frequencies and preliminary association with the diagnosis of asthma. *Genes Immun* 5: 343-346.
85. Hoffjan S, Stemmler S, Parwez Q, Petrasch-Parwez E, Arinir U, et al. (2005) Evaluation of the toll-like receptor 6 Ser249Pro polymorphism in patients with asthma, atopic dermatitis and chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Med Genet* 6: 34.
86. Kesh S, Mensah NY, Peterlongo P, Jaffe D, Hsu K, et al. (2005) TLR1 and TLR6 polymorphisms are associated with susceptibility to invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. *Ann N Y Acad Sci* 1062: 95-103.
87. Sales ML, Schreiber R, Ferreira-Sae MC, Fernandes MN, Piveta CS, et al. (2010) Toll-like receptor 6 Ser249Pro polymorphism is associated with lower left ventricular wall thickness and inflammatory response in hypertensive women. *Am J Hypertens* 23: 649-654.
88. Askar E, Ramadori G, Mihm S (2010) Toll-like receptor 7 rs179008/Gln11Leu gene variants in chronic hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 82: 1859-1868.
89. Oh DY, Baumann K, Hamouda O, Eckert JK, Neumann K, et al. (2009) A frequent functional toll-like receptor 7 polymorphism is associated with accelerated HIV-1 disease progression. *Aids* 23: 297-307.

90. Shen N, Fu Q, Deng Y, Qian X, Zhao J, et al. (2010) Sex-specific association of X-linked Toll-like receptor 7 (TLR7) with male systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 15838-15843.
91. Sanchez E, Callejas-Rubio JL, Sabio JM, Gonzalez-Gay MA, Jimenez-Alonso J, et al. (2009) Investigation of TLR5 and TLR7 as candidate genes for susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 27: 267-271.
92. Schott E, Witt H, Neumann K, Taube S, Oh DY, et al. (2007) A Toll-like receptor 7 single nucleotide polymorphism protects from advanced inflammation and fibrosis in male patients with chronic HCV-infection. *J Hepatol* 47: 203-211.
93. Engin A, Arslan S, Kizildag S, Ozturk H, Elaldi N, et al. (2010) Toll-like receptor 8 and 9 polymorphisms in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Microbes Infect* 12: 1071-1078.
94. Davila S, Hibberd ML, Hari Dass R, Wong HE, Sahiratmadja E, et al. (2008) Genetic association and expression studies indicate a role of toll-like receptor 8 in pulmonary tuberculosis. *PLoS Genet* 4: e1000218.
95. Chen Z, Ma G, Qian Q, Yao Y, Feng Y, et al. (2009) Toll-like receptor 8 polymorphism and coronary artery disease. *Mol Biol Rep* 36: 1897-1901.
96. Carvalho A, Osorio NS, Saraiva M, Cunha C, Almeida AJ, et al. (2011) The C allele of rs5743836 polymorphism in the human TLR9 promoter links IL-6 and TLR9 up-regulation and confers increased B-cell proliferation. *PLoS One* 6: e28256.
97. Sam-Agudu NA, Greene JA, Opoka RO, Kazura JW, Boivin MJ, et al. (2010) TLR9 polymorphisms are associated with altered IFN-gamma levels in children with cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg* 82: 548-555.
98. Zhou XJ, Lv JC, Cheng WR, Yu L, Zhao MH, et al. (2010) Association of TLR9 gene polymorphisms with lupus nephritis in a Chinese Han population. *Clin Exp Rheumatol* 28: 397-400.
99. Pandey S, Mittal B, Srivastava M, Singh S, Srivastava K, et al. (2011) Evaluation of Toll-like receptors 3 (c.1377C/T) and 9 (G2848A) gene polymorphisms in cervical cancer susceptibility. *Mol Biol Rep* 38: 4715-4721.

100. Dai Q, Li XP, Chai L, Long HA, Yang ZH (2014) Polymorphisms of Toll-like receptor 9 are associated with nasopharyngeal carcinoma susceptibility. *Tumour Biol* 35: 3247-3253.
101. Lazarus R, Raby BA, Lange C, Silverman EK, Kwiatkowski DJ, et al. (2004) TOLL-like receptor 10 genetic variation is associated with asthma in two independent samples. *Am J Respir Crit Care Med* 170: 594-600.
102. Lin Y-T, Verma A, Hodgkinson CP (2012) Toll-like receptors and human disease: lessons from single nucleotide polymorphisms. *Current genomics* 13: 633.
103. Du X, Poltorak A, Wei Y, Beutler B (2000) Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur Cytokine Netw* 11: 362-371.
104. Valverde Villegas JM (2011) Estudio de los polimorfismos G2848A y T-1237C del gen TLR9 en dos poblaciones con enfermedad inflamatoria intestinal (eii) del sur de Brasil.
105. (2008) TLR9 toll-like receptor 9 [*Homo sapiens* (human)]. pp. The protein encoded by this gene is a member of the Toll-like receptor (TLR) family which plays a fundamental role in pathogen recognition and activation of innate immunity. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/54106#>.
106. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, et al. (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408: 740-745.
107. Jahantigh D, Salimi S, Alavi-Naini R, Emamdadi A, Owaysee Osquee H, et al. (2013) Association between TLR4 and TLR9 gene polymorphisms with development of pulmonary tuberculosis in Zahedan, southeastern Iran. *ScientificWorldJournal* 2013: 534053.
108. Takeshita F, Gursel I, Ishii KJ, Suzuki K, Gursel M, et al. Signal transduction pathways mediated by the interaction of CpG DNA with Toll-like receptor 9; 2004. Elsevier. pp. 17-22.
109. Hashemi-Shahri SM, Taheri M, Gadari A, Naderi M, Bahari G, et al. (2014) Association Between TLR8 and TLR9 Gene Polymorphisms and Pulmonary Tuberculosis. *Gene Cell Tissue* 1: e18316.

110. Verthelyi D, Zeuner RA (2003) Differential signaling by CpG DNA in DCs and B cells: not just TLR9. *Trends in immunology* 24: 519-522.
111. Dalgic N, Tekin D, Kayaalti Z, Cakir E, Soylemezoglu T, et al. (2011) Relationship between toll-like receptor 8 gene polymorphisms and pediatric pulmonary tuberculosis. *Dis Markers* 31: 33-38.
112. Yoon HJ, Choi JY, Kim CO, Park YS, Kim MS, et al. (2006) Lack of Toll-like receptor 4 and 2 polymorphisms in Korean patients with bacteremia. *J Korean Med Sci* 21: 979-982.
113. Cheng PL, Eng HL, Chou MH, You HL, Lin TM (2007) Genetic polymorphisms of viral infection-associated Toll-like receptors in Chinese population. *Transl Res* 150: 311-318.
114. Nguyen TH, Mai NL, Le TP, Ha V, Nguyen TC, et al. (2009) Toll-like receptor 4 (TLR4) and typhoid fever in Vietnam. *PLoS One* 4: e4800.
115. Gazouli M, Mantzaris G, Kotsinas A, Zacharatos P, Papalambros E, et al. (2005) Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population. *World J Gastroenterol* 11: 681-685.
116. Tao K, Fujii M, Tsukumo S, Maekawa Y, Kishihara K, et al. (2007) Genetic variations of Toll-like receptor 9 predispose to systemic lupus erythematosus in Japanese population. *Ann Rheum Dis* 66: 905-909.
117. Liu F, Lu W, Qian Q, Qi W, Hu J, et al. (2012) Frequency of TLR 2, 4, and 9 gene polymorphisms in Chinese population and their susceptibility to type 2 diabetes and coronary artery disease. *J Biomed Biotechnol* 2012: 373945.
118. Torres-Garcia D, Cruz-Lagunas A, Garcia-Sancho Figueroa MC, Fernandez-Plata R, Baez-Saldana R, et al. (2013) Variants in toll-like receptor 9 gene influence susceptibility to tuberculosis in a Mexican population. *J Transl Med* 11: 220.
119. Kobayashi K, Yuliwulandari R, Yanai H, Naka I, Lien LT, et al. (2012) Association of TLR polymorphisms with development of tuberculosis in Indonesian females. *Tissue Antigens* 79: 190-197.

120. Thada S, Valluri VL, Gaddam SL (2013) Influence of Toll-like receptor gene polymorphisms to tuberculosis susceptibility in humans. *Scand J Immunol* 78: 221-229.
121. Lazarus R, Klimecki WT, Raby BA, Vercelli D, Palmer LJ, et al. (2003) Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies. *Genomics* 81: 85-91.
122. Noguchi E, Nishimura F, Fukai H, Kim J, Ichikawa K, et al. (2004) An association study of asthma and total serum immunoglobulin E levels for Toll-like receptor polymorphisms in a Japanese population. *Clin Exp Allergy* 34: 177-183.
123. Berghofer B, Frommer T, Konig IR, Ziegler A, Chakraborty T, et al. (2005) Common human Toll-like receptor 9 polymorphisms and haplotypes: association with atopy and functional relevance. *Clin Exp Allergy* 35: 1147-1154.
124. Carvalho A, Marques A, Maciel P, Rodrigues F (2007) Study of disease-relevant polymorphisms in the TLR4 and TLR9 genes: a novel method applied to the analysis of the Portuguese population. *Mol Cell Probes* 21: 316-320.
125. Lachheb J, Dhifallah IB, Chelbi H, Hamzaoui K, Hamzaoui A (2008) Toll-like receptors and CD14 genes polymorphisms and susceptibility to asthma in Tunisian children. *Tissue Antigens* 71: 417-425.
126. Hamann L, Glaeser C, Hamprecht A, Gross M, Gomma A, et al. (2006) Toll-like receptor (TLR)-9 promotor polymorphisms and atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 364: 303-307.
127. Hur JW, Shin HD, Park BL, Kim LH, Kim SY, et al. (2005) Association study of Toll-like receptor 9 gene polymorphism in Korean patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 65: 266-270.
128. Torok HP, Glas J, Tonenchi L, Bruennler G, Folwaczny M, et al. (2004) Crohn's disease is associated with a toll-like receptor-9 polymorphism. *Gastroenterology* 127: 365-366.
129. Peixoto-Rangel AL, Miller EN, Castellucci L, Jamieson SE, Peixe RG, et al. (2009) Candidate gene analysis of ocular toxoplasmosis in Brazil: evidence for a role for toll-like receptor 9 (TLR9). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 1187-1190.

130. Smirnova I, Hamblin MT, McBride C, Beutler B, Di Rienzo A (2001) Excess of rare amino acid polymorphisms in the Toll-like receptor 4 in humans. *Genetics* 158: 1657-1664.
131. Lammers KM, Ouburg S, Morre SA, Crusius JB, Gionchett P, et al. (2005) Combined carriership of TLR9-1237C and CD14-260T alleles enhances the risk of developing chronic relapsing pouchitis. *World J Gastroenterol* 11: 7323-7329.
132. Kikuchi K, Lian ZX, Kimura Y, Selmi C, Yang GX, et al. (2005) Genetic polymorphisms of toll-like receptor 9 influence the immune response to CpG and contribute to hyper-IgM in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 24: 347-352.

Anexo A



México, D. F., a ____ de _____ de 20 ____.

Consentimiento informado:

En el Hospital Fundación Nuestra Señora de la Luz se llevará a cabo un estudio titulado **“BÚSQUEDA DE MARCADORES GENÉTICOS ASOCIADOS A BLEFARITIS”** El cual se realizará en el Centro de Investigación Biomédica, este estudio está bajo responsabilidad del Dr. Héctor Javier Pérez Cano.

Se necesitaran muestras de raspado palpebral (raspado del párpado) cuya obtención no representa ningún riesgo para mi salud. He sido informado que este estudio será utilizado para fines de investigación y que, en caso de ser paciente del

instituto, la toma de muestra **NO** modifica mi diagnóstico, mi tratamiento ni la atención recibida por parte del personal de la institución.

Es por eso que:

Yo _____ acepto participar en este estudio y autorizo que se obtenga una muestra de lágrima y sangre.

Firma: _____ Teléfono _____

Responsable de toma de muestra: _____

Testigo: _____

Testigo: _____