

Polimorfismo del gen TLR2 como factor de riesgo en la infección oftálmica por adenovirus

Dra. Mónica Amato-Almanza, Dr. Víctor Manuel Bautista de Lucio, Dr. Héctor Javier Pérez-Cano, Dra. Herlinda Mejía-López

RESUMEN

Introducción: El receptor tipo Toll2 (TLR-2), juega un papel central en la respuesta inmune innata a una amplia variedad de microorganismos. Los polimorfismos en el gen TLR-2 (Arg677Trp, Arg753Gln) se asocian con alto riesgo de infecciones por *Mycobacterium sp*, *Candida albicans*, virus del Herpes Simple Tipo 2 y otros. Los polimorfismos en TLR2 son muy importantes para la dimerización y señalización de TLR.

Objetivo: Investigar la relación entre los polimorfismos en TLR2 y la infección ocular por adenovirus en población Mexicana.

Métodos: Se estudiaron 33 muestras de pacientes con conjuntivitis por adenovirus y 10 controles sanos, se extrajo DNA, se amplificó con PCR una región del gen TLR2 que codifica la parte citosólica de este receptor y se analizó con secuenciación directa.

Resultados: No encontramos heterocigotos para TLR2 Arg677Trp y Arg753Gln, sin embargo encontramos Phe707Phe en 5 pacientes con una frecuencia alélica de 7.5%. Las muestras de controles no mostraron ningún polimorfismo.

Conclusiones: El polimorfismo Phe707Phe puede tener un papel clave en el riesgo de infección por adenovirus. Es importante ampliar la población para conocer la frecuencia alélica real de esta variante genética y determinar si es un verdadero marcador de susceptibilidad a la infección en la población mexicana.

Palabras clave: Polimorfismo de TLR2, respuesta inmune a adenovirus, queratoconjuntivitis por adenovirus.

SUMMARY

Introduction: Toll-like receptor 2 (TLR-2), plays a central role in the innate immune response to a wide variety of microorganisms. Polymorphisms for TLR-2 gene (Arg677Trp, Arg753Gln) are associated with high risk infections of *Mycobacterium sp*, *Candida albicans*, *Herpes Simplex Virus Type 2* and others. TLR2 gene polymorphisms are critical to TLR dimerization and signaling.

Objective: Investigate the relationship between TLR2 gene polymorphisms and adenoviral ocular infection in Mexican population.

Methods: Thirty three samples from patients with adenoviral conjunctivitis and ten samples from healthy subjects as controls were studied. DNA genomic was extracted, a region TLR2 gene which encodes the cytosolic part of the receptor was amplified by PCR and analyzed by direct sequencing.

Results: We did not found heterozygous for the TLR2 Arg677Trp and Arg753Gln. However we found Phe707Phe in five patients with a heterozygous frequency of 7.5%, and control samples do not showed any polymorphisms.

Conclusions: The Phe707Phe polymorphism could play an important role in the infection risk by adenovirus, it is important to increase the population to know the real allelic frequency and to determine if this genetic variant is a true marker of susceptibility to infection in the Mexican population.

Key words: Polymorphism of TLR2, Immune response to adenovirus, queratoconjuntivitis by adenovirus.

INTRODUCCIÓN

Los Adenovirus (Ad) causan múltiples enfermedades clínicas que afectan sistemas ocular, respiratorio, urinario y gastrointestinal. Las manifestaciones clínicas varían de espo-

rádicas a epidémicas sin producir signos o síntomas patonómicos, son usualmente agudas y autolimitadas, pero en niños muy pequeños pueden ser fatales o estar asociados con daños crónicos. Se conocen más de 100 genotipos y se han identificado 6 subgéneros (A-F), basados en varias ca-

racterísticas biológicas y moleculares y se han reportado 51 de ellos capaces de infectar al hombre (1-3).

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

En la queratoconjuntivitis epidémica el adenovirus induce una respuesta inflamatoria aguda intensa. Los signos clínicos incluyen epífora, edema palpebral, formación de pseudomembranas conjuntivales con hemorragia y queratitis epitelial punteada o geográfica. En ausencia de una terapia antiviral efectiva, el tratamiento típicamente incluye compresas frías, lágrimas artificiales y, en casos seleccionados, antibióticos tópicos y/o corticosteroides. Incluso con tratamiento de soporte, la intensa respuesta inflamatoria conjuntival puede llevar a la formación de simblefaron permanente y ojo seco. En la córnea se desarrollan típicamente múltiples infiltrados subepiteliales (ISE) en los primeros 7-10 días, tras el inicio de los signos clínicos de infección que pueden persistir durante meses o años. Los ISE son casi literalmente el *sine qua non* de la queratoconjuntivitis epidémica. En un estudio realizado con pacientes diagnosticados con queratoconjuntivitis epidémica, un tercio de los mismos tuvieron ISE durante más de 45 días desde el inicio del cuadro (9).

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

Se ha demostrado que los receptores que aparecen en células Toll de *Drosophyla* sp (TLRs), desempeñan un papel esencial en accionar la respuesta inmune innata reconociendo una gran variedad de patrones moleculares asociados de

bacterias, virus, protozoos y hongos. Las señales iniciadas por la interacción de TLRs con los antígenos que reconocen (ligandos específicos) dirigen la respuesta inflamatoria, que intenta eliminar al patógeno y lleva a la respuesta adaptativa (10). En humanos se han identificado diez TLRs (TLR1–TLR10) (10, 11).

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

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

En este estudio nos propusimos estudiar los SNP de la región citosólica (dominio TIR) debido a que se han relacionado con la unión de de la molécula adaptadora MyD 88, mecanismo fundamental en la activación celular por TLR2 (14).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 33 muestras históricas de raspado conjuntival de pacientes con diagnóstico clínico de conjuntivitis por adenovirus confirmado por PCR. Como controles fueron estudiadas muestras de sangre de 10 individuos de población abierta sin antecedente de conjuntivitis folicular y clínicamente sanos.

Extracción de ADN

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

PCR específico para el sitio TIR de TLR2

Se realizó PCR de las posiciones 2170 al 2570 del gen de TLR2. Esta región corresponde a una fracción del sitio citosólico del receptor conocido como dominio TIR, en donde se encuentran los SNPs Arg677Trp y Arg753Gln. Cada reacción fue hecha en un volumen total de 20 µl conteniendo 10 µl de la HotStar Taq Master Mix Polimerase (QIAGEN Sciences. Maryland, USA), con 2.5 U de Taq polimerasa, 1.5 mM de Mg₂Cl, 200µM de cada dNTP, 1X del buffer de reacción y 0.5 µM de los oligonucleótidos TLR2F 5'-atgcc-tactgggtggagaacct-3' y TLR2R 5'-ctgagagctgcgataaagtc-3'.

El producto de amplificación es de 411pb. La amplificación fue realizada por 95°C/15 min, y 40 ciclos a 94°C/1 min, una Tm de 59.2°C/1 min 72°C/1 min y una extensión a 72°C/10 min. La reacción se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer Co. Norwalk, Connecticut). Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio (1 µg/ml). Se usó como marcador de pesos moleculares el Ready-Load 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, L.T.). Las bandas con el amplificado fueron cortadas para su posterior purificación utilizando los reactivos de Qiaex II kit (Qiagen, Hilden, Germany).

Secuenciación del amplicón TIR

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

ANÁLISIS DE RESULTADOS

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

RESULTADOS

Se procesaron 33 muestras de pacientes con infección con adenovirus para la secuenciación del dominio TIR de TLR2 con el objetivo de buscar los SNPs Arg677Trp y Arg753Gln. Las frecuencias alélicas observadas para Arg677Trp fueron del 100% para el alelo C y 0% para el alelo T en pacientes y controles, mientras que para Arg753Gln la frecuencia alélica fue del 100% para el alelo G y el alelo A estuvo ausente. Interesantemente se encontró un SNP sinónimo Phe707Phe en las muestras de la población infectada que corresponde a una frecuencia alélica del 7.5%, sin embargo, el análisis de X^2 no reportó resultados estadísticamente significativos.

DISCUSIÓN

La respuesta inmune contra adenovirus ha sido muy estudiada debido a que este virus se ha propuesto como un vector que pueda portar material genético en la terapia génica.

Es bien conocido que los adenovirus utilizan el receptor para coxsackievirus y adenovirus (CAR) para adherirse y entrar a la célula, además está demostrado que la unión a este receptor estimula la respuesta inmune (17). Otra vía de estimulación podría estar inducida por el virus a través de TLRs.

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

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

Por último, reportes recientes indican que variantes genéticas (polimorfismos) en los genes de la respuesta inmune innata están asociados con desórdenes en la respuesta inflamatoria. Se cree que deficiencias a nivel de RRP afecta la maduración del sistema inmune e inclina la balanza hacia la enfermedad. El papel de los factores genéticos es determinante en la susceptibilidad a la infecciones y se ha hecho más evidente en la actualidad; algunas personas parecen estar predispuestas a ciertas infecciones, mientras que otras están protegidas (21). Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el gen TLR-2 (Arg677Trp, Arg753Gln) se asocian con alto riesgo de infecciones severas como son las producidas por *Mycobacterium sp*, *Candida albicans*, virus del Herpes Simple Tipo 2 y otros. Estudios recientes han demostrado que los polimorfismos en el gen TLR2, dentro del dominio TIR (aminoácidos 643-784) son muy importantes para la dimerización con MyD88, una molécula clave en la señalización por TLR (16, 22-24).

Los resultados obtenidos hasta el momento, en este trabajo, representan un estudio preliminar que requiere del análisis de una población mayor tanto de muestras de pacientes como de controles clínicamente sanos, para conocer la frecuencia alélica real de esta variante genética, y determinar si es un verdadero marcador de susceptibilidad a la infección en la población mexicana.

REFERENCIAS

1. Schmitz H, Wigand R, Heinrich W. Worldwide epidemiology of human adenovirus infections. *Am J Epidemiol* 1983; 117:455-466.
2. Horwitz MS. Adenoviruses Chapter 68. En Fields DM, Knipe PM, Howley y cols. *Fields Virology*. 3ra. Ed. Philadelphia. Lippincott Raven Publishers 1996; 2155.
3. De Jong JC, Wermenbol AG, Verweij-Uijterwaal MW, Slaterus KW y cols. Wertheim. Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3940-3945.
4. Cooper RJ, Yeo AC, Bailey AS, Tullo AB. Adenovirus polymerase chain reaction assay for rapid diagnosis of conjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:90-95.
5. Takeuchi S, Itoh N, Uchio E, Aoki K, Ohno S. Serotyping of adenoviruses on conjunctival scrapings by PCR and sequence analysis. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1839-1845.
6. Shepetiuk SK, Norton R, Kok T, Irving LG. Outbreak of adenovirus type 4 conjunctivitis in South Australia. *J Med Virol* 1993; 41:316-318.
7. Jernigan JA, Lowry BS, Hayden FG, Kyger SA, Conway BP, Groschel DH y cols. Adenovirus type 8 epidemic keratoconjunctivitis in an eye clinic: risk factor and control. *J Infect Dis* 1993; 167:1307-1313.
8. Adhikary AK, Numaga J, Kaburaky T, Kawashima H, Kato S, Araie M y cols. Rapid detection and typing of oculo-pathogenic strain of subgroup D adenoviruses by fiber-based PCR and restriction enzyme analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42:2010-2015.
9. Butt AL, Chodosh J. Adenoviral keratoconjunctivitis in a tertiary care eye clinic. *Cornea* 2006; 25:199-202.
10. Sandor F, Buc M. Toll like receptors. I. Structure, function and their ligands. *Folia Biologica (Praha)* 2005; 51:148-156.
11. Du X, Poltorak A, Wei Y, Beutler B. Tree novel mammalian toll-like receptor: gene structure, expression and evolution. *Eur Cytokine Netw* 2000; 11:362-371.
12. Hajjar AM, O'Mahony DS, Ozinsky A, Underhill DM y cols. Cutting edge: Functional interaction between Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J Immunol* 2001; 166:15-19.
13. Morrison LA. The Toll of herpes simplex virus infection. *Trends Microbiol* 2004; 12:353-356.
14. Texereau J, Chiche JD, Taylor W, Choukroun G, Comba B, Mira JP. The importance of Toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections. *Clin Infect Dis* 2005; 41:S408-415.
15. Murawski M R, Bowen GN, Cerny AM, Anderson LJ y cols. Respiratory syncytial virus activates innate immunity through Toll-like receptor 2. *J Virol* 2009; 83:1492-1500.
16. Bochud PY, Magaret AS, Koelle DM, Aderem A, Wald A. Polymorphisms in TLR2 are associated with increased viral shedding and lesional rate in patients with genital herpes simplex virus Type 2 infection. *J Infect Dis* 2007; 196:497-498.
17. Thomas CE, Edwards P, Wickham TJ, Castro MG, Lowenstein PR. Adenovirus binding to the coxsackievirus and adenovirus receptor or integrin is not required to elicit brain inflammation but is necessary to traduce specific neural cells types. *J Virol* 2002; 76:3452-3460.
18. Appledorn DM, Patial S, McBride A, Godbehere S, Van Rooijen N y cols. Adenovirus vector-induced innate inflammatory mediators, MAPK signaling, as well as adaptive immune responses are dependent upon both TLR2 and TLR9 in vivo. *J Immunol*. 2008; 181:2134-2144.
19. Zhang X, Chentoufi AA, Dasgupta G, Nesburn AB y cols. A genital tract peptide epitope vaccine targeting TLR-2 efficiently induces local and systemic CD8+ T cells and protects against herpes simplex virus type 2 challenge. *Mucosal Immunol* 2009; 2:129-143.
20. Jin X, Qin Q, Chen W, Qu J. Expression of toll-like receptors in the healthy and herpes simplex virus-infected cornea. *Cornea* 2007; 26:847-852.
21. Hill A. The genomics and genetics of human infectious disease susceptibility. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001; 2:373-400.
22. Kutukculer N, Sozeri Yeniay B, Aksu G, Berdeli A. Arg753Gln Polymorphism of the Human Toll-like Receptor-2 Gene in Children and with Recurrent Febrile Infections, *Biochem Gen* 2007; 45:7-8.
23. Meriem B, Barbouche M, Bousnina S, Chabbou A, Dellagi K. Toll-Like Receptor 2 Arg677Trp Polymorphism Is Associated with Susceptibility to Tuberculosis in Tunisian Patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11:625-626.
24. Woehrle T, Du W, Goetz A, Hsu H, Joos T y cols. Pathogen specific cytokine release reveals an effect of TLR2 Arg753Gln during *Candida* sepsis in humans. *Cytokine* 2008; 41:322-329.