

Variaciones genéticas en TLR2 y asociación con estenosis aórtica degenerativa.

Realizado por: REBECA TORRES MERINO

Tutores:

Trabajo Fin de Máster.

Máster en Investigación Biomédica.

INDICE:

INTRODUCCIÓN

1. Inmunidad innata y adquirida
2. Receptores tipo Toll (TLRs).
 - Estructura
 - Descripción de los diferentes TLRs
3. Estenosis aórtica degenerativa.
 - Grados de estenosis
4. Relación entre TLR2 y enfermedades vasculares.
5. Caracterización del gen TLR2
6. Hipótesis
7. Objetivos

PACIENTES Y METODOS

1. Criterios de selección de pacientes y controles.
2. Obtención de pellet a partir de sangre periférica
3. Obtención de ADN a partir de pellet
4. Cuantificación de ADN mediante el NanoDrop
5. Polimorfismos asociados
6. Genotipado con sondas KASP
7. RFLP
8. Gel de acrilamida al 8%
9. Gel de agarosa al 2%
10. Visualización de los productos de digestión
11. Análisis de los resultados.

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

INTRODUCCIÓN

1. Inmunidad Innata y Adquirida

Inmunidad adquirida, específica o adaptativa: Es exclusiva de vertebrados. Tarda una semana en desarrollarse y es la responsable de la memoria inmunológica. Es específica, ya que es capaz de identificar distintos patógenos muy similares por los antígenos que los distinguen, mejora el reconocimiento con cada uno de los contactos y lo recuerda durante mucho tiempo (20).

Inmunidad innata o inespecífica: Está presente en todos los seres vivos. Carece de memoria inmunológica, pero en cambio es rápida. Nacemos con ella, es por lo tanto capaz de combatir la infección desde el mismo momento de su inicio y durante sus primeras fases. No identifica grupos concretos, sino más bien grupos de patógenos. Utiliza siempre receptores idénticos entre sí que reconocen moléculas comunes a grupos de patógenos (20).

En el reconocimiento de los patógenos por las células de la respuesta inmune innata participa un grupo de receptores a los que se ha denominado receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRRs). Dentro de este grupo de receptores de respuesta innata se incluyen los receptores tipo Toll o TLRs (Toll-like Receptors), CLR (receptores Lectin tipo C), RLR (RIG-I, retinoica acid-inducible gene-I, like receptors) y NLR (Nod-like receptors). Estos receptores detectan patrones moleculares presentes en los microorganismos patógenos, a los que se denomina Patrones Moleculares Asociados a Patógenos o PAMPs, que son esenciales para la supervivencia y patogenicidad del microorganismo, por lo que tienen una tasa de mutación mínima (2). Son moléculas muy conservadas, capaces de inducir una fuerte respuesta del sistema inmune innato.

En los últimos años se ha visto que también son capaces de reconocer moléculas propias, a las que se ha llamado DAMPs o patrones moleculares asociados a daño para referirse a las moléculas propias que se producen como consecuencia de un daño excesivo en los tejidos y que actúan como señales de peligro endógenas (2).

La activación de los receptores de la inmunidad innata da lugar a una respuesta inmediata, poniendo en marcha distintas funciones celulares como son la fagocitosis y la secreción de gránulos intracelulares, citoquinas, enzimas, moléculas de adhesión 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.

2. Receptores Tipo Toll (TLRs)

La familia de los receptores Toll-like constituye uno de los grupos más importantes dentro de los PRR. Se describieron por primera vez en *Drosophila*, donde se vio que participaban en la respuesta inmune frente a hongos induciendo la síntesis de péptidos antimicrobianos. En 1997 se descubrieron sus homólogos en mamíferos a los que se denominó receptores tipo Toll o TLR. Hasta el momento se han descrito 10 TLRs diferentes en humanos, los cuales difieren en los ligandos que reconocen, en el patrón de expresión y probablemente los genes que inducen. También existe un gen TLR11 en humanos, pero contiene varios codones stop por lo que no se expresa la proteína (17).

La vía de activación asociada a la activación de los diferentes TLRs puede ser independiente o dependiente de MyD88 (respuesta de diferenciación mieloide primaria gen 88). La vía independiente, utiliza como molécula adaptadora a TRIF (dominio TIR que contiene proteínas adaptadoras que inducen interferón β). En ambos casos se activan señales de comunicación intracelular en la que participan el NF- κ B (factor de transcripción nucleolar potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B activadas) y la cascada de la MAPK (Mitogen-activated protein Kinases o Proteín kinasas activadas por mitógenos), que dan lugar a la expresión de citocinas proinflamatorias (9).

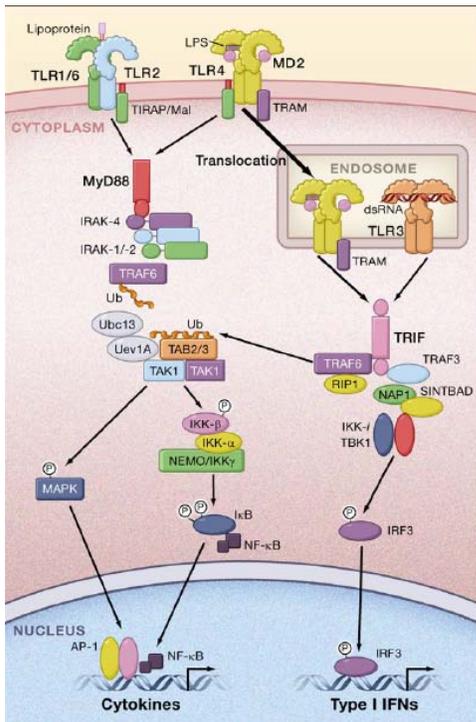


Figura 1.

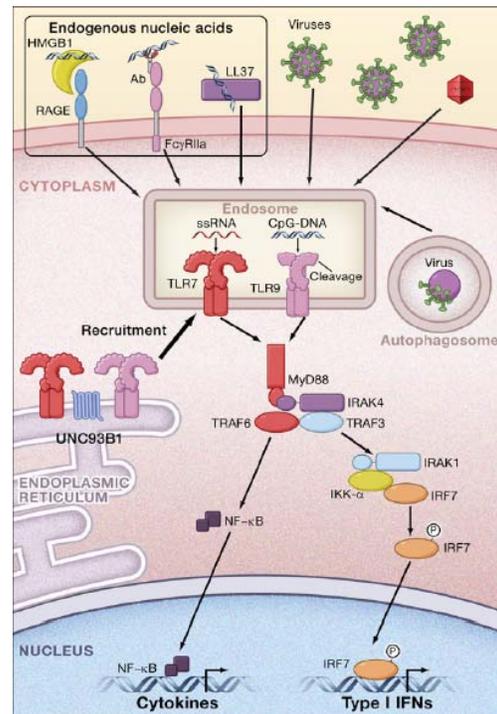


Figura 2.

Figura 1: se observa la activación de la cascada de señalización dependiente de MyD88 producida por el reconocimiento de lipoproteínas y liposacáridos (LPS) que son reconocidos en la superficie celular por un heterodímero formado por TLR 1/6 y TLR2 y también vemos la vía desencadenada por el complejo TLR4/MD2. En esta misma figura observamos como TLR3 y TLR4 activación de la cascada de señalización dependiente de TRIF.

Figura 2: representa la activación de la cascada de señalización a partir de la unión de TLR7 y TLR9 a sus respectivos ligandos.

Estructura de los TLRs:

Los TLRs son proteínas transmembrana tipo I, que contienen un dominio intracelular y un dominio extracelular:

El dominio intracelular tiene homología con el de los receptores para IL-1 (Interleucina-1) y se denomina TIR (Toll-IL-1R). Está formado por tres regiones altamente homólogas, que se denominan box 1, 2 y 3 (17). Este dominio TIR se asocia a proteínas adaptadoras con un elevado grado de homología como es la proteína MyD88 (11).

Por el contrario, los dominios extracelulares difieren marcadamente de los de IL-1. Los TLRs poseen repeticiones en tandem de regiones ricas en leucina conocidas como LRR (17) y presentan una estructura muy conservada entre insectos y humanos (9).

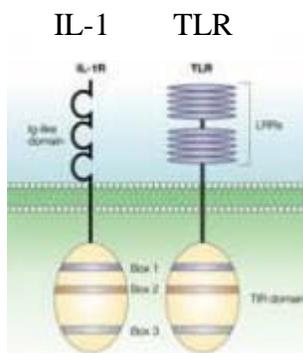


Figura 3. Observamos las diferencias y similitudes existentes entre el receptor TLR y el de IL-1.

Figura 3.

Descripción de los diferentes TLRs:

TLR1: Receptor que se encuentra en la membrana plasmática y reconoce peptidoglicanos y lipoproteínas de bacterias. Funcionalmente se asocia con TLR2 y tiene una alta homología con TLR6. (2)

TLR2: Receptor localizado en la membrana plasmática y que reconoce diferentes componentes de virus, hongos, micoplasmas y bacterias como son lipoarabinomanano, peptidoglicano (PGN), diversos glicolípidos y glicofosfatidilinositales. TLR2 no actúa como un receptor monomérico, sino que su actividad requiere interacciones heterodiméricas con TLR1 o TLR6 (1). El complejo TLR2/TLR6 no es activado por lipoproteínas triacetiladas y si por lipoproteínas diacetiladas, mientras que por el contrario el complejo TLR2/TLR1 es activado por lipoproteínas triacetiladas, pero no por diacetiladas (2).

TLR3: Es un receptor endosomal que reconoce ARN vírico de doble cadena (2). El RNA vírico es un potente inductor de la producción de interferón tipo 1 (IFN-a e INF-b) ejerciendo un efecto antiviral e inmunoestimulador a través de la maduración de las células dendríticas (23).

TLR4: Receptor que se encuentra en la membrana plasmática y reconoce lipopolisacáridos (LPS) bacterianos, un componente integral de la membrana externa de bacterias Gram negativas, formado por un núcleo de oligosacáridos, una cadena O-específica, compuesta por secuencias repetidas de polisacáridos hidrofílicos, y un dominio hidrofóbico llamado lípido A que es el responsable de la actividad biológica. El reconocimiento de LPS y la señalización por TLR4 requiere la presencia de dos co-receptores, MD2 (factor mielóide de diferenciación 2) y CD14 (Cluster de diferenciación 14). MD2, está en la superficie celular físicamente asociado al dominio extracelular de TLR4 (2, 9).

TLR5: Receptor que se encuentra en la membrana plasmática y reconoce la flagelina bacteriana (2).

TLR6: Receptor que se encuentra en la membrana plasmática y reconoce lipoproteínas diacetiladas procedentes de bacterias y virus (2).

TLR7: Es un receptor endosomal que reconoce RNAs de virus, bacterias y ácidos nucleicos de patógenos endógenos (2).

TLR8: Es un receptor que pertenece a la subfamilia del TLR9 y junto con TLR7 también reconoce compuestos antivirales. Reconoce RNAs de algunos virus y del propio hospedador (2).

TLR9: Receptor endosomal que reconoce ácidos nucleicos de bacterias, virus y de patógenos endógenos. Reconoce secuencias CpG no metiladas de DNA bacteriano (2).

TLR10: Receptor endosomal. Es el último TLR descubierto, todavía se desconoce cuál es el ligando de este receptor (2, 17).

3. Estenosis aórtica degenerativa

La estenosis aórtica degenerativa es una enfermedad lentamente progresiva que incluye en su fase inicial la esclerosis aórtica y en fases más avanzadas la estenosis aórtica degenerativa. La prevalencia de la EAO-d es alta y depende directamente de la edad. Más del 2% de pacientes mayores de 75 años tienen una estenosis aórtica severa (1) y supone un 8% de los mayores de 84 años. La evolución de la enfermedad, una vez que aparecen los síntomas, es rápida y la mortalidad es superior al 50% a los 3 años si no se realiza una sustitución valvular.

La EAO-d es un trastorno de la válvula aórtica en la que se estrecha o se produce una obstrucción gradual de dicha válvula. El ventrículo izquierdo adapta la sobrecarga de la presión sistólica a través de un proceso de hipertrofia que se traduce en un aumento del engrosamiento de su pared, este aumento en el grosor de la pared es suficiente para contrarrestar la alta presión sistólica intracavitaria, lo que hace que la tensión sistólica de la pared se mantenga en un rango “normal”, hasta que los mecanismos compensadores fallan.

La relación inversa entre la tensión sistólica de la pared y la fracción de eyección (porcentaje del volumen diastólico que es eyectado en cada sístole) se mantiene, pero incrementos en la tensión de la pared y alta postcarga, causan una disminución de la fracción de eyección. También una disminución de la contracción del estado de miocardio puede ser responsable de una disminución en la fracción de eyección. (7)

Si en el proceso de hipertrofia el engrosamiento de la pared no es proporcional al aumento de la presión, un aumento en el estrés de la pared y la alta postcarga causan una disminución en la fracción de eyección.

El resultado del engrosamiento de la pared del ventrículo izquierdo produce una disminución de la complianza (distensibilidad) de la cámara y disminución del volumen, en el ventrículo izquierdo al final de la diástole se produce un incremento de la presión sin cambios de dilatación de la cámara. (7)

El desarrollo de hipertrofia parece ser una adaptación beneficiosa para compensar el incremento de la presión intracavitaria, pero desafortunadamente, esta adaptación también conlleva unas consecuencias adversas, ya que se ha visto que esta adaptación produce una reducción del flujo coronario y una limitada reserva vasodilatadora. (7)

En mujeres se ha visto especialmente que un excesivo grado de hipertrofia produce un mayor engrosamiento de la pared que es necesario para contrarrestar la alta presión intracavitaria. (7)



Figura 4. Representa EAO-d calcificada (14).

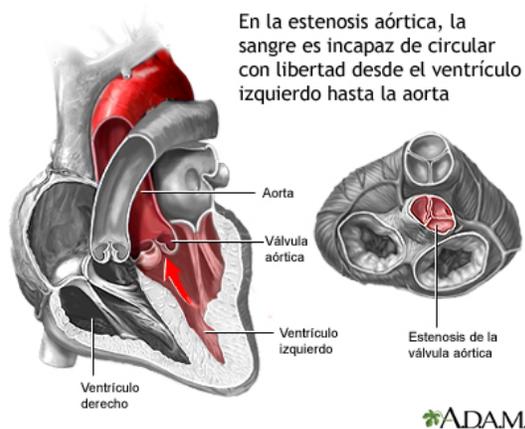


Figura 5.

La estenosis aórtica puede estar presente desde el nacimiento (congénita) o se puede desarrollar posteriormente en la vida (adquirida). Los niños con estenosis aórtica pueden tener otras afecciones congénitas.

En los adultos, la estenosis aórtica puede ser degenerativa o reumática (15). La fiebre reumática es una afección que se puede desarrollar después de una amigdalitis estreptocócica o una escarlatina. La estenosis aórtica degenerativa es la enfermedad valvular más frecuente en adultos de países desarrollados. Los factores de riesgo asociados a esta enfermedad son: edad avanzada, sexo masculino, hipertensión, hiperlipidemia, diabetes y personas fumadoras (4, 13, 14). Otros estudios recientes también la asocian a un índice de masa corporal bajo y a la edad.

También se ha observado que determinadas infecciones virales aumentan la probabilidad de padecer estenosis aórtica. (5)

Estudios recientes indican que la estenosis aórtica degenerativa en adultos es un proceso activo iniciado en parte por daño mecánico y mediado por infiltración de lípidos o por una reacción inflamatoria crónica (3). Por otra parte, estudios histopatológicos han demostrado que las válvulas aórticas degenerativas presentan una acumulación de células inflamatorias, macrófagos y linfocitos T (14).

En modelos *in vivo* que han desarrollado hipercolesterolemia en edades tempranas, se ha visto que esto lleva a un proceso de esclerosis y a una posterior calcificación de la válvula aórtica. Se han encontrado relaciones entre los altos niveles de colesterol y calcificaciones en la válvula aórtica en estenosis aórtica degenerativa. (13)

También hay estudios que han confirmado que enfermedades en las válvulas aórticas son comunes en la vejez y aproximadamente uno de cada cuatro individuos con valvulopatía aórtica se observa engrosamiento o calcificación o ambos al aumentar la edad (1,13).

En el desarrollo de esta enfermedad no solamente están involucrados factores ambientales, ya que estudios recientes sugieren que también están involucrados factores genéticos (6, 18, 21, 22). En estos estudios se determinan que:

1. Polimorfismos en el receptor de la vitamina D es más común en pacientes con EAo-d. (18)
2. Pérdida de función en el receptor Notch1 debido a mutaciones, esto tiene implicaciones en el desarrollo de anomalías congénitas en el corazón así como la aceleración de la calcificación valvular (18).
3. El polimorfismo PvuII en el receptor alfa de estrógenos está asociado con la presencia de estenosis aórtica en mujeres posmenopáusicas y con elevados niveles de lípidos en mujeres adolescentes (18).

Grados de estenosis aórtica.

La graduación de la severidad de la estenosis aórtica la podemos estudiar mediante el estudio ultrasonográfico midiendo el gradiente de presión y el área valvular. La clasificación de la severidad es la siguiente (7):

a) Ligera: área de 1.5 cm², gradiente medio menor de 25 mmHg o velocidad del chorro (eyección) menor de 3 m/s.

b) Moderada: área de 1 a 1.5 cm², gradiente medio entre 25 a 40 mmHg o velocidad de eyección de 3 a 4 m/s.

c) Severa: área menor de 1 cm², gradiente medio mayor de 40 mmHg o velocidad de eyección mayor de 4 m/s.

4. Relación entre TLR2 y enfermedades vasculares

La activación de TLR2 modifica la acumulación de lipoproteínas en las células endoteliales: La expresión de TLR2 aumenta con hiperlipidemia mantenida, mientras que las deficiencias en TLR2 reducen los cambios inducidos por dicha hiperlipidemia en la morfología del endotelio (8).

También el proceso de calcificación en células intersticiales de válvulas aórticas humanas está mediado por la expresión de TLR2 y apoya el papel de los TLRs en el proceso de calcificación en estenosis aórtica (5).

Estudios recientes han asociado el polimorfismo R753Q con un incremento significativo de riesgo de padecer endocarditis infecciosa tanto para un modelo co-dominante, como recesivo y dominante (12). El polimorfismo R753Q es un factor de riesgo asimismo para la reestenosis coronaria (reaparición de estenosis tras haberse sometido a una

corrección), ya que se ha demostrado un incremento de la frecuencia alélica de éste polimorfismo en aquellos pacientes que han desarrollado reestenosis (6).

5. Caracterización del gen TLR2

El gen TLR2 se encuentra en el brazo largo del cromosoma 4 en la posición 31.3 (4q31.3), consta de un único exón.

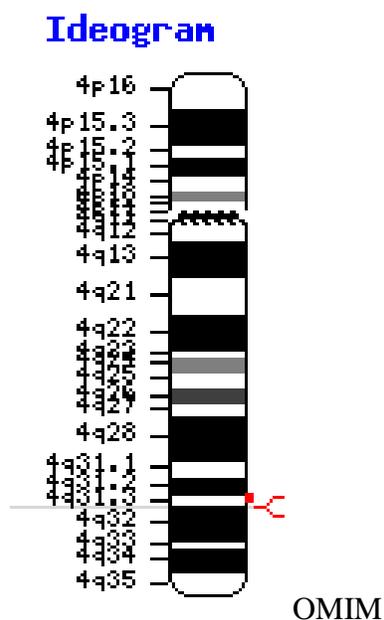


Figura 6.

6. Hipótesis

Los TLRs juegan un papel determinante en la patogénesis de la estenosis aórtica degenerativa (EAo-d). Concretamente:

- a) Polimorfismos en el gen TLR2 aumentan la susceptibilidad a desarrollar EAo-d en nuestra población.
- b) Existe una relación entre los polimorfismos de TLR2 y el fenotipo (características clínicas, morfológicas, hemodinámicas y pronósticas) de los pacientes con EAo-d.

Existe una relación entre los polimorfismos de TLR2 y el fenotipo (características clínicas, morfológicas, hemodinámicas y pronósticas) de los pacientes con EAo-d.

7. Objetivos del trabajo

El objetivo de este trabajo es analizar la relación que pueda existir entre los diferentes polimorfismos estudiados en el gen TLR2 y la EAo-d.

Previamente hemos revisado las frecuencias alélicas y genotípicas para cada uno de estos polimorfismos descritas para la población Caucásica-Europea, para posteriormente poder realizar una comparativa con los resultados que hemos obtenido.

PACIENTES Y METODOS

1. Criterios de selección de pacientes y recolección de sangre periférica:

Se trata de un estudio de casos y controles de pacientes reclutados (300 sanos y 300 controles). El tamaño de la muestra fue calculado usando el recurso web "genetica power calculador" para una frecuencia hipotética del marcador del 10%, confiriendo un riesgo relativo de 2, para un error alfa de 5% y un poder del 80%.

Todos los pacientes son adultos españoles diagnosticados mediante criterios estándar de estenosis aórtica moderada y severa (7) durante un ecocardiograma fueron reclutados tanto en consultas externas como en planta de hospitalización del servicio de cardiología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, del mismo modo fueron reclutados los controles.

Previo consentimiento informado se obtuvo una muestra de sangre periférica mediante procedimiento estándar. Ambos grupos deben de cumplir los siguientes criterios:

Pacientes sanos (controles):

Deben de ser mayores de 18 años, relacionados con su respectivo caso por su edad y sexo, con estudio ecocardiográfico en el que se aprecien válvulas estructuralmente normales. De este grupo, se han estudiado 17 muestras.

Pacientes con estenosis:

Deben de ser mayores de 18 años con diagnóstico por criterios de estenosis aórtica degenerativa moderada o severa: área valvular menor de 1.5 cm² o gradiente medio en la válvula aórtica mayor a 25 mmHg o velocidad sistólica máxima del chorro aórtico mayor de 3 m/s.

Se excluirán pacientes con criterios ecocardiográficos de valvulopatía de origen reumático y aquellos que presenten cardiopatía congénita.

También se les ha realizado otras pruebas que han sido importantes para el criterio de selección, como han sido ergoespirometría y resonancia magnética.

Se han estudiado 90 pacientes con EAo-d, con edades comprendidas entre 50-100 años.

2. Obtención de pellet a partir de sangre periférica:

Solución de lisis, para 1 litro contiene:

Tris 10 mM pH 7.6: 1.211 g

ClK 10 mM: 0.745 g

MgCl₂ + 6H₂O 10 mM: 2.033 g

Preparación solución de lisis:

1. Se pesan las cantidades y se van echando en la probeta de 1l.
2. Echar agua mili Q hasta 800 ml y poner en el agitador.
3. Ajustar el pH 7.6 con HCl (2-3 gotas)
4. Enrasar hasta 1 l con agua mili Q.

Método de obtención de Pellet a partir de sangre periférica:

1. 50 % solución del buffer de lisis + 50% de sangre.
2. 5 cm³ de sangre y 120 µl de solución Nonidet (6 gotas que se añaden con la pipeta Pasteur). El Nonidet rompe las membranas celulares.
3. Agitar lentamente hasta que desaparecen los grumos de Nonidet pegados en la pared del tubo.
4. Centrifugar 15 min a 2000 rpm.
5. Decantar
6. Congelar a -20 °C

3. Obtención de ADN a partir de pellet:

Usamos el Kit de extracción Ultra Clean (DNA Blood Isolation Kit) de MO BIO.

1. 300 μ l de pellet + 900 μ l de solución G1.
2. Dejar a temperatura ambiente durante 5 minutos e ir moviendo de vez en cuando.
3. Centrifugar 1 min a 13000 gs
4. Eliminar el sobrenadante. Se echa en un vaso de precipitados. Importante no apurar.
5. Llevar al vortex para resuspender.
6. Añadir 300 μ l de solución G2. Es importante disolver bien el pellet, para evitar la formación grumos.
7. Añadir 1.5 μ l de R-Nasa en cada tubo (muestra) y pasar por el vortex.
8. Añadir 100 μ l de solución G3 y pasar por el vortex durante 15 segundos.
9. Centrifugar 2 min a 13000 gs. (Precipitan las proteínas)
10. Pasar el sobrenadante a otro tubo y tiramos el precipitado.
11. Añadimos al sobrenadante 300 μ l de isopropanol. Movemos el tubo hasta que vemos que aparece una medusa de color blanco.
12. Centrifugar 2 min a 13000 gs. Se precipita el ADN.
13. Se decanta el sobrenadante y se añaden 300 μ l de etanol al 70%.
14. Centrifugar 2 min a 13000 gs y decantar el sobrenadante (Tiramos el sobrenadante)
15. Dejamos abiertos los tubos durante toda la noche para que se seque el precipitado.
16. Una vez seco añadimos 100 μ l de solución G4 y se conserva en frigorífico a 4°C.

4. Cuantificación ADN mediante el NanoDrop.

El NanoDrop ND1000 (Spectrophotometer) ha sido utilizado para cuantificar la concentración de ADN (ng/ μ l) y la calidad de ADN, tomando como valores óptimos de calidad aquellos valores que tengan un ratio 260/280 igual o superior a 1.6.

1. Abrimos el programa ND-1000.
2. Seleccionamos la opción ADN50.
3. Lavamos con agua HyPure (Molecular Biology Grade Water, libre de nucleasas de Thermo Scientific) la zona de lectura.
4. Hacer blanco con agua HyPure
5. Poner 2 μ l de la muestra de ADN.
6. Dar a la opción leer y nos dará la concentración en μ g/de ADN, datos sobre la calidad y absorbancia.
7. Lavar la zona de lectura con agua HyPure.

Observación: Después la lectura de cada muestra o cuando lavamos debemos eliminar los restos con un papel.

5. Polimorfismos estudiados

La selección de los SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) a analizar, se realizó mediante una estrategia de tagging (selección de los SNPs en función de una característica determinada) para capturar la variación genética en la vía del TLR2. Para ello establecimos que la menor frecuencia alélica (MAF) debe ser mayor a 0.001.

Los polimorfismos estudiados hasta el momento en este gen han sido los siguientes: rs469687, rs3804100, rs3804099, rs11938228, rs2289318, rs7674579, rs1816702, rs1898830, rs5743704 y rs5743708.

6. Genotipado con sondas KASP.

	µl por pocillo
DNA	2 µl
H₂O	2 µl
Mix	4 µl
Sonda	0,11 µl

Los volúmenes indicados corresponden a los aconsejados por el fabricante de los primers marcados y de la Mix (KBio science) para placas de 96 pocillos. Los primers marcados son específicos para cada polimorfismo, y la Mix ha sido la misma para la detección de todos los polimorfismos.

Condiciones de los ciclos de PCR:

Temperatura	Tiempo	
94 °C	15 min	
94°C	20 seg	10 ciclos
65-57°C	60 seg	
94°C	20 seg	30 ciclos
57°C	60 seg	

El genotipado se ha llevado a cabo mediante la tecnología KASP (KBioscience) basado en sondas FRET (Fluorescent resonante energy transfer) con una primera etapa de PCR alelo específica. Ésta se lleva a cabo en un termociclador Eppendorf® utilizando ADN a una

concentración de 20 ng/μl. El producto de ésta PCR se somete a un ciclo de melting de 15 segundos a 37°C en el Light Cycler 480® de Roche Diagnostic para posteriormente poder observar la distribución de la población mediante diferentes fluoróforos (FAM, HEX). Los analizamos mediante la opción Endpoint Genotyping y la fluorescencia observada será diferente en función del genotipo que porte cada individuo: en homocigotos vemos sólo la señal del fluoróforo correspondiente, mientras que en heterocigoto se observa las correspondientes a los dos fluoróforos. FAM se excita a 485 nm y emite a 520 nm, mientras que HEX se excita a 535 nm y emite a 556 nm.

El genotipado mediante este método consta de:

Dos primers específicos de alelo (uno para cada SNP). Cada uno de ellos contiene una secuencia única no marcada en el extremo 5'.

Un primer común (reverse).

Dos oligos marcados con fluoróforos en el extremo 5' (FAM y HEX). Las secuencias de estos oligos están diseñadas para interactuar con las secuencias de las colas de los primers específicos de alelos.

Dos oligos con el quencher unido al extremo 3'. Las secuencias de estos oligos son complementarias a las de los oligos marcados con fluoróforos.

Antes de realizar cualquier análisis de los polimorfismos a estudio, hemos realizado una validación del proceso de genotipado usando el Kit de validación de KBioscience, para comprobar que la lectura de la placa es correcta tras la utilización de éste método.

7. RFLPs

Método mediante el cual secuencias específicas de nucleótidos son reconocidas y cortadas por enzimas de restricción, obteniendo de este modo diferentes patrones de bandas que difieren entre los individuos con diferentes genotipos.

En el caso de R753Q en el que hubo discrepancia en el análisis de resultados obtenidos en el Light Cycler 480® de Roche Diagnostic, se comprobaron los genotipos mediante RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), utilizando las enzimas *AciI* y *SfcI*.

Realizamos la PCR de las muestras que queremos contrastar bajo las siguientes condiciones:

Temperatura	Tiempo	
94 °C	15 min	
94°C	20 seg	10 ciclos
65-57°C	60 seg	
94°C	20 seg	30 ciclos
57°C	60 seg	

TLR2: R753Q (rs5743708) primers: 5`-GATGAGAACAATGATGCTGCCATTC-3` y 5`CTAGGACTTTATCGCAGCTCTC-3`. Los primers fueron sintetizados por VWR International Eurolab, Barcelona, Spain. (12)

La Master Mix para PCR es de Promega, Madison, Wisconsin, United States.

Volúmenes para PCR:

DNA (20 ng/ µl)	4 µl
H2O	4,6 µl
Forguas	0,7 µl
Reverse	0,7 µl
Master Mix	10 µl
Volumen total	20 µl

La selección de las enzimas específicas para la comprobación de este polimorfismo se realizó mediante el programa Webcutter 2.0.

Las enzimas utilizadas para este polimorfismo fueron FastDigest® *Acil* (Fermentas, Burlington, Canada) incubación a 37°C durante 5 minutos y *SfcI* (Fermentas, Burlington, Canada) a 37°C durante toda la noche.

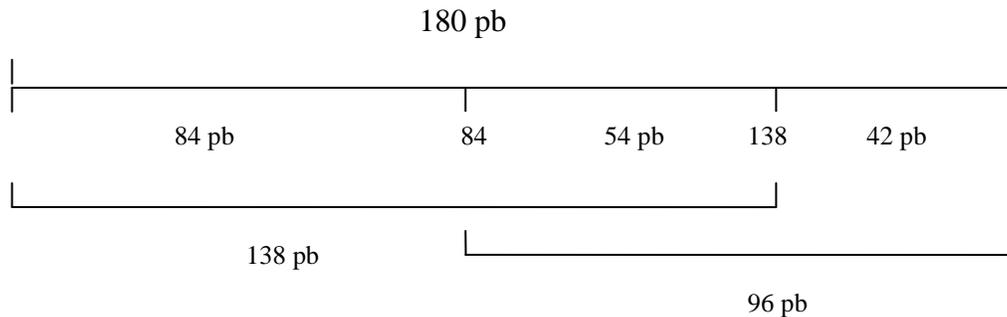
Acil corta el alelo G (más frecuente) y *SfcI* corta el alelo A (menos frecuente).

Ambas enzimas están a una concentración 1:10 U/µl

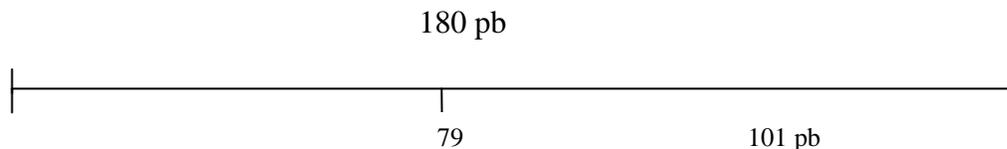
De los 20 µl totales utilizo 10 µl para digerir con la enzima y 10 µl sin digerir. A los 10 µl que utilizo para hacer la digestión añado:

Producto de PCR	Enzima	Buffer
10 µl	1 µl	1,2 µl

La secuencia amplificada por los primers anteriores tiene un tamaño de 180 pb, y la enzima *AciI* tiene 2 puntos de corte en esta secuencia, uno en la posición 84 y otra en la 138, por lo que para homocigotos en el alelo más frecuente (G/G) observaríamos tres bandas de tamaños diferentes, una de 84 pb, 54 pb y 42 pb. En los heterocigotos (G/A) observaremos bandas con los siguientes tamaños: 138 pb, 84 pb, 54 pb y 42 pb.



A continuación observamos el patrón de corte para la enzima *SfcI* para el amplificado obtenido con los primers anteriores. Esta enzima solamente tiene un punto de corte en la secuencia amplificada y es en la posición 79, por lo que en heterocigotos (G/A) con el corte de esta enzima debemos de ver dos banda, una de 79 pb y otra de 101 pb.



Posteriormente incubamos las muestras con la enzima que nos interesa para nuestro ensayo, durante el tiempo y bajo las condiciones indicadas adecuadas.

Sometemos los productos de digestión a electroforesis en un gel de acrilamida al 8% o de agarosa al 2% para poder ver los resultados y realizar el análisis.

8. Gel de Acrilamida al 8%.

Composición del gel de Acrilamida al 8%:

- 7 ml de Acrilamida-bisacrilamida 37.5:1 al 40% (BIO RAD)
- 0.7 ml de TAE (Tris-Acético-EDTA) 50 X
- Hasta 30 ml de agua mili Q

50 µl de Temed + 50 µl de PA (Persulfato amónico) (BIO RAD)

Método:

Montaje de los cristales.

- Limpiar con etanol la cara de los cristales que va a estar en contacto con el gel.
- Colocar los separadores sobre el cristal grande.
- Colocar el cristal pequeño encima de los separadores.
- Sujetar los 2 cristales con unas torres (se forma un sándwich).
- Asegurarnos de que la parte inferior de los cristales esté bien alineada para evitar que se pierda el gel.
- Colocar el sándwich de manera vertical en el soporte y ajustarlo.

Introducir solución acrilamida al 8%

- Añadimos la solución de acrilamida al 8% con una jeringuilla entre los cristales montados previamente
- Colocamos el peine en la zona superior evitando que queden burbujas y dejamos que polimerice.

9. Gel de Agarosa 2%

Realización gel agarosa 2%.

Para geles de 17 pocillos:

26 ml de TBE (Tris-borato-EDTA) 0.5X + 0.44 g de Agarosa + 1.3 µl de RedSafe (iNtRON BIOTECHNOLOGY).

Para geles de 8 pocillos:

13 ml de TBE 0.5X + 0.22 g de agarosa + 0.65 µl de RedSafe (iNtRON BIOTECHNOLOGY).

Carga del gel de agarosa 2%

- Ponemos el gel en la cubeta que contiene TBE 0.5X, el TBE 0.5X tiene que cubrir por completo al gel.
- Cargamos en cada pocillo 5 µl de ADN con 2 µl de buffer de carga, previamente ya mezclados. En uno pocillo ponemos 1 µl de marcador de 50 pb con 2 µl de buffer de carga y 4 µl de TBE 0.5X.
- Tapamos la cubeta y realizamos la electroforesis a 100V durante 30 minutos.

10. Visualización de los productos de digestión

Los resultados de las digestiones han sido vistos mediante electroforesis en acrilamida al 8% teñido con Gel red™ de Biotium o en gel de agarosa al 2% teñido con RedSafe (iNtRON BIOTECHNOLOGY) observados bajo luz ultravioleta utilizando el transiluminador de BIO RAD con el programa Quantity one.

11. Análisis

Una vez obtenidos los resultados analizamos la gráfica de fluorescencias obtenidas y posteriormente revisamos los valores numéricos para poder decidir si la distribución dada por el HRM es la correcta.

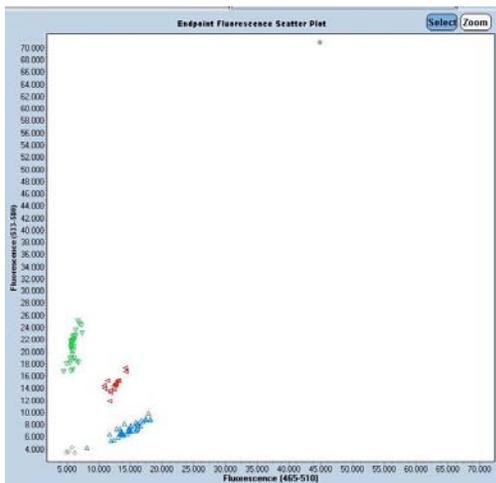


Figura 7.

Figura 7. En esta figura observamos la distribución perfecta, en la que vemos homocigotos en paralelo al eje X y al eje Y, mientras que los heterocigotos en la parte intermedia.

RESULTADOS

La población a estudio con la que hemos trabajado está formada por pacientes con edades comprendidas entre 50-100 años, mayor número de pacientes con estenosis aórtica severa que moderada, debido al mayor número de pacientes con edades superiores a los 80 años, en nuestro estudio también está formado por un mayor número de hombres (n=55) que de mujeres (n=35).

Tras haber realizado el genotipado de 90 pacientes con estenosis y 17 controles para 10 polimorfismos diferentes para el gen TLR2 (rs469687, rs3804100, rs3804099, rs11938228, rs2289318, rs7674579, rs1816702, rs1898830, rs5743704 y rs5743708) hemos intentado encontrar alguna relación entre la presencia de estenosis aórtica degenerativa severa o moderada y la presencia o ausencia de los diferentes polimorfismos

SNP (TLR2)	Cambio nt	% éxito*	Frec. Alelo más frecuente	Fr. Alelo menos frecuente	Fr. Genotíp Homo. Más frecuente	Fr. Genotípica Heteroc	Fr. Genotípica Hom. Menos frecuente	p valor	χ^2
rs5743708	G>A	97,78	0,977	0,023	0,954	0,045	0	0,8273	0,047
rs5743704	C>A	96,67	0,932	0,068	0,875	0,113	0,011	0,321	0,983
rs3804100	T>C	98,89	0,916	0,089	0,831	0,168	0	0,3853	0,754
rs4696187	T>C	96,67%	0,86	0,14	0,73	0,26	0,011	0,487	0,481
rs1898830	A>G	100%	0,665	0,335	0,45	0,42	0,125	0,595	0,282
rs7674579	T>G	98,91%	1	0	1	0	0		
rs2289318	C>G	97,77%	0,82	0,18	0,66	0,32	0,023	0,5147	0,424
rs1816702	T<C	100,00%	0,833	0,167	0,833	0	0,167	0	90
rs11938228	C>A	97,77%	0,653	0,346	0,41	0,48	0,102	0,4596	0,547
rs3804099	C<T	97,77%	0,55	0,45	0,3	0,5	0,2	0,9377	0,006

Tabla 1. Frecuencias alélicas, genotípicas, p valor y χ^2 de la población de pacientes con EAo-d.

En la siguiente tabla comparamos las frecuencias alélicas del HapMap con las de nuestra población de estudio.

SNP (TLR2)	Cambio nt	HapMap		Población del estudio con EAo-d			
		Frec. Alelo más frecuente	Fr. Alelo menos frecuente	Frec. Alelo más frecuente	Fr. Alelo menos frecuente	p valor	χ^2
rs5743708	G>A	0,948	0,052	0,977	0,023	0.1483	1.35
rs5743704	C>A	0,95	0,05	0,932	0,068	0.4543	0.25
rs3804100	T>C	0,945	0,051	0,916	0,089	0.1563	1.44
rs4696187	T>C	0,836	0,164	0,86	0,14	0.522	0.23
rs1898830	A>G	0,686	0,314	0,665	0,335	0.6714	0.1
rs7674579	T>G	0,992	0,008	1	0	0.18	0.137
rs2289318	C>G	0,767	0,233	0,82	0,18	0.2161	1.22
rs1816702	T<C	0,858	0,142	0,833	0,167	<0.0001	31.76
rs11938228	C>A	0,704	0,296	0,653	0,346	0.3078	0.82
rs3804099	C<T	0,549	0,451	0,55	0,45	1	0.01

Tabla 2. Comparación entre frecuencia alélicas obtenidas del HapMap con nuestra población a estudio.

El éxito del genotipado es mayor al 96% en todos los casos. No se encontró diferencia significativa entre las frecuencias alélicas entre los casos de nuestro estudio y los obtenidos en el HapMap. Todos los polimorfismos estudiados en nuestra población a excepción del polimorfismo rs1816702 están en equilibrio de Hardy-Weinberg. En nuestro estudio vemos que para éste polimorfismo no tenemos población heterocigota.

En la siguiente tabla mostramos los valores obtenidos de nuestra población control.

CONTROLES

SNP (TLR2)	Cambio nt	% éxito	Frec. Alelo más frecuente	Fr. Alelo menos frecuente	p valor	χ^2
rs5743708	G>A	94,12	1	0		
rs5743704	C>A	100	1	0		
rs3804100	T>C	100	1	0		
rs4696187	T>C	94,11	0,84	0,16	0,458851	0,51
rs1898830	A>G	100	0,79	0,21	0,285091	1,1426
rs7674579	T>G	100	1	0		
rs2289318	C>G	100	0,823	0,176	0,4322	0,882
rs1816702	T<C	94,11	0,91	0,09	0,171	0,67
rs11938228	C>A	100	0,794	0,206	0,28	1,048
rs3804099	C<T	100	0,53	0,47	0,0858	2,95

Tabla 3. Frecuencias alélicas, χ^2 y p valor de nuestra población control. (n=17)

No se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias alélicas y genotípicas para los polimorfismos genotipados del TLR2 entre casos con estenosis aórtica degenerativa y los controles sanos. Sin embargo el polimorfismo rs3804099 muestra una tendencia a la significación ($p=0.086$) indicando una posible asociación con el desarrollo de estenosis aórtica degenerativa.

A continuación se muestran algunas de las gráficas obtenidas en el Light Cycler 480® de Roche Diagnostic.

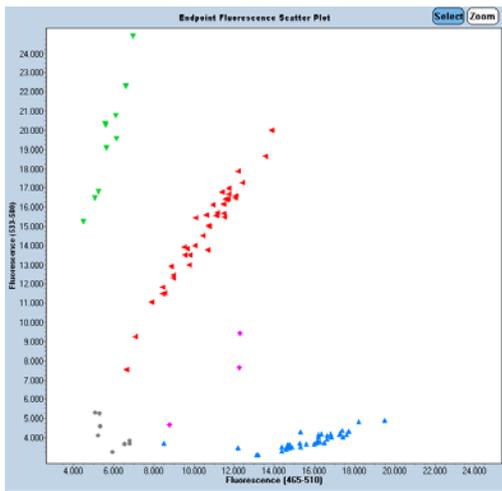


Figura 8. rs 1898830

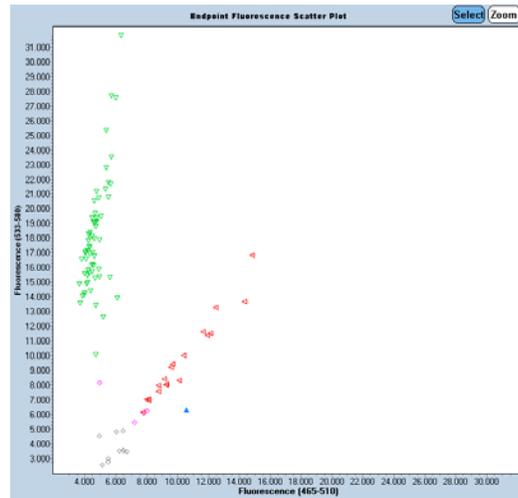


Figura 9. rs 4696187

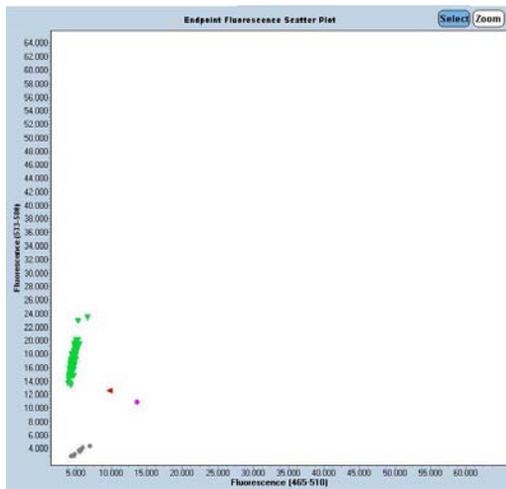


Figura 10. rs 5743708

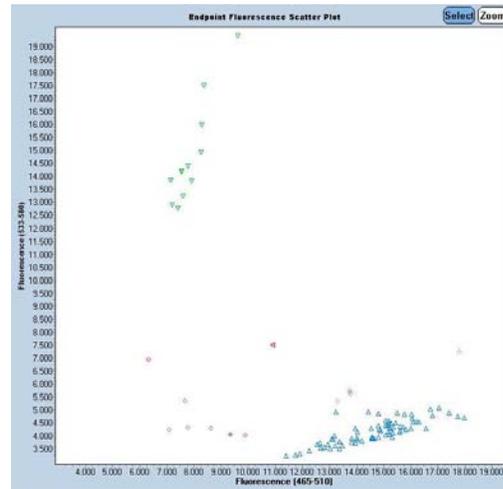


Figura 11. rs 1816702

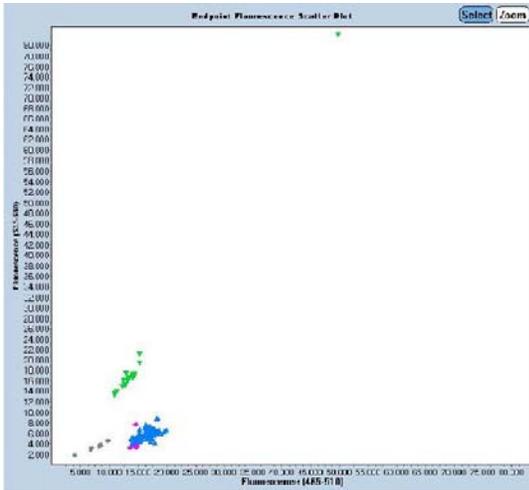


Figura 12. rs 3804100

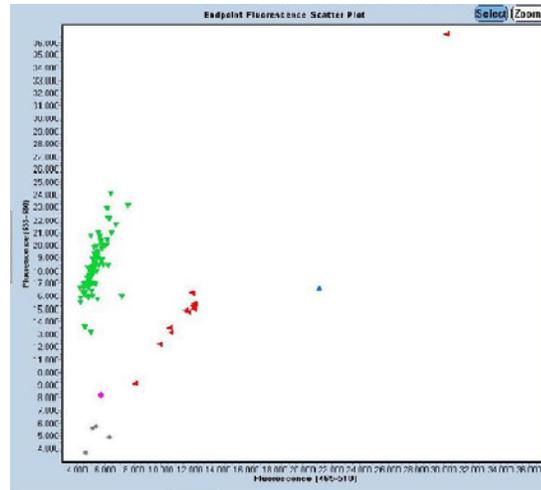


Figura 13. rs5743704

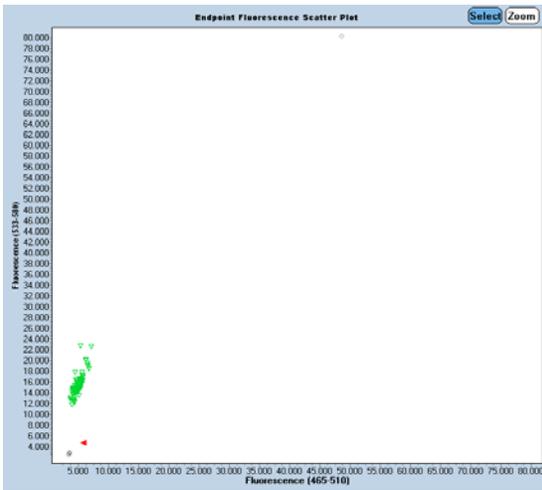


Figura 14. rs 7674579

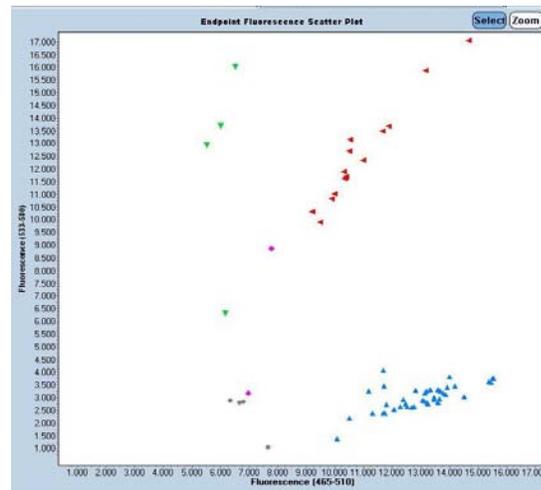


Figura 15. rs2289318

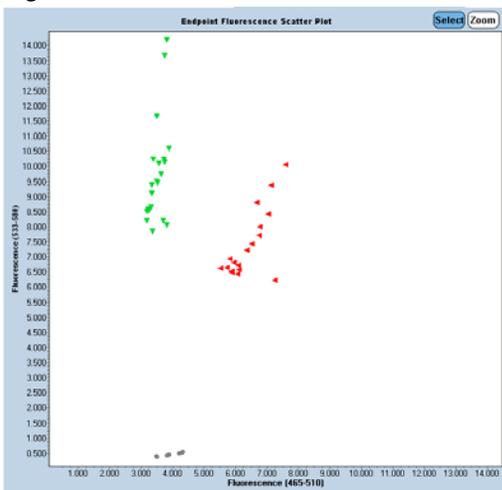


Figura 16. rs11938228

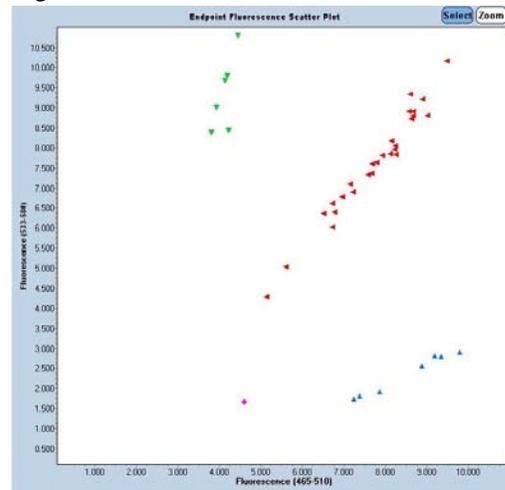


Figura 17. rs 3804099

Hemos utilizado enzimas de restricción para comprobar algún resultado dudoso obtenido mediante el Light Cycler 480® de Roche Diagnostic para el polimorfismo rs5743708.

TLR2 R753Q (rs5743708):

Resultado estenosis		
Gln/Gln (A/A)	Arg/Arg (G/G)	Gln/Arg (A/G)
0	84	4
0	95.45%	4.5%

Resultado controles		
Gln/Gln (A/A)	Arg/Arg (G/G)	Gln/Arg (A/G)
0	16	0
0	100%	0

Los resultados obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa 2% han sido los siguientes:

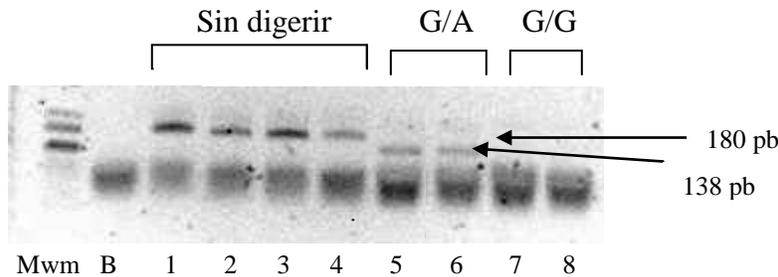


Figura 18. Resultados obtenidos de la digestión con *AciI* del amplificado correspondiente al polimorfismo rs5743708. Las muestras 5 y 6 corresponden a pacientes heterocigotos (G/A) y la 7 y 8 a homocigotos (G/G)

El marcador de peso molecular (Mwm) es de 50 pb tanto en el gel de azarosa al 2% como en el de acrilamida al 8%

Para mejorar la visualización de las bandas de menor tamaño se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%.

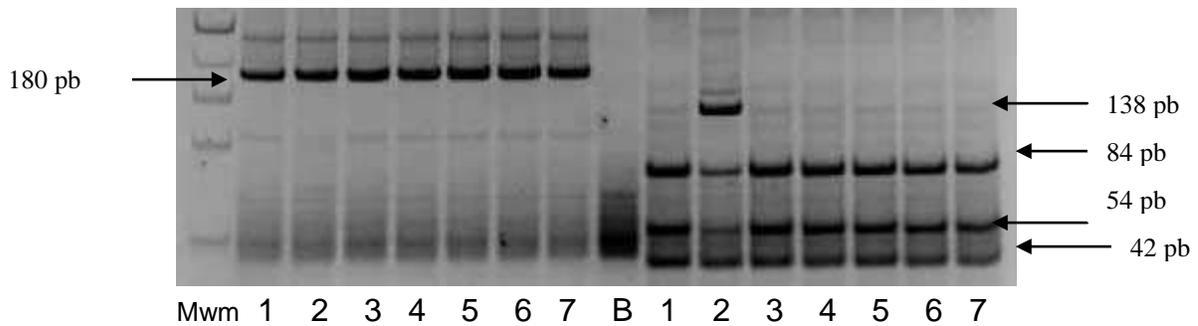


Figura 19.

Figura 19. Comprobación del genotipo de 7 pacientes para el polimorfismo rs5743708 mediante digestión con *AciI*. Las 7 primeras muestras están sin digerir y las 7 últimas corresponden a las mismas muestras a las que se ha añadido la enzima *AciI*. En éstas últimas observamos pacientes homocigotos para el alelo más frecuente (G/G), ya que se observa que la banda de 180 pb ha sido digerida en 3 bandas de 84, 54 y 42 pb. El pocillo n° 2 corresponde a un paciente heterocigoto (G/A) ya que se observa la banda de 138 pb.

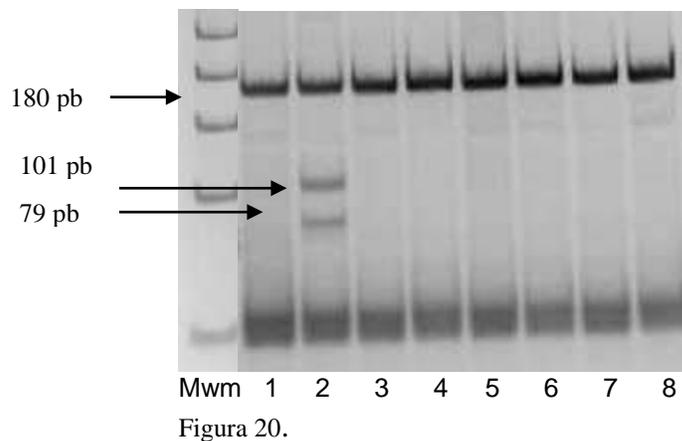


Figura 20. Digestión con *SfcI*, en la que observamos un paciente heterocigoto (G/A) en el pocillo nº2. La presencia del alelo G elimina el sitio de restricción de *SfcI*.

DISCUSIÓN

Tras haber realizado el estudio en 90 pacientes con estenosis aórtica degenerativa y 17 sanos (controles) no hemos encontrado ninguna diferencia en los polimorfismos estudiados con la información obtenida del HapMap, a excepción del polimorfismo rs1816702 que no se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, el resto de polimorfismo se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg.

El desequilibrio encontrado en el polimorfismo rs1816702 se debe a que en nuestra población no hemos encontrado individuos heterocigotos. Por lo que nos planteamos que la técnica utilizada para el genotipado puede que no sea la adecuada para genotipar este polimorfismo y encontrar heterocigotos. Sería necesario realizar el genotipado mediante otro método, para ello sería necesario diseñar unos nuevos primers específicos a la zona de amplificación., para poder realizar RFLPs.

Nuestra población control no la podemos comparar con la población enferma debido al número tan reducido de muestras estudiadas. El tamaño de la muestra explicaría la falta de resultados positivos dado que el poder que obtenemos es bajo y solo detectaría diferencias en las que la variación polimórfica concediera riesgos muy elevados de padecer la enfermedad.

En nuestra población enferma hemos encontrado más pacientes con estenosis aórtica degenerativa severa que moderada, debido a que la edad de detección en la población que tenemos a estudio está envejecida y es más frecuentemente hospitalizada por el aumento de la gravedad de la enfermedad.

Diversos estudios han relacionado el envejecimiento con la estenosis aórtica (4, 13, 14, 19). Nuestros resultados son concordantes, ya que la edad de detección de la enfermedad en los pacientes estudiados está comprendida entre 50 y 100 años, aunque la gran mayoría son octogenarios.

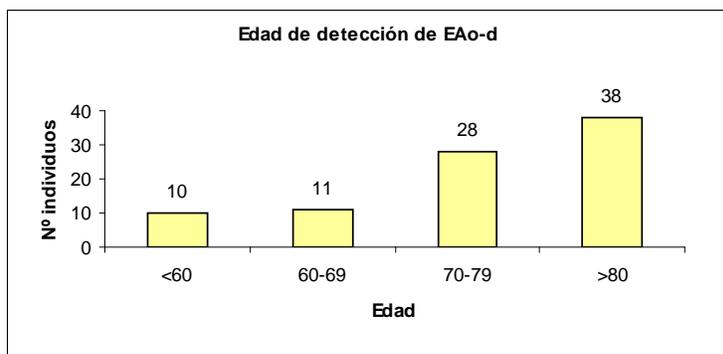


Figura 21. Edad en la que se ha detectado EAo-d en los individuos a estudio.

También puede confirmar que según los datos que tenemos en estudio, esta enfermedad es más frecuente en hombres que en mujeres, ya que de los 90 pacientes estudiados 55 son hombres y 35 mujeres. Estos datos apoyan lo señalado en estudios anteriores (4, 13, 14, 19).

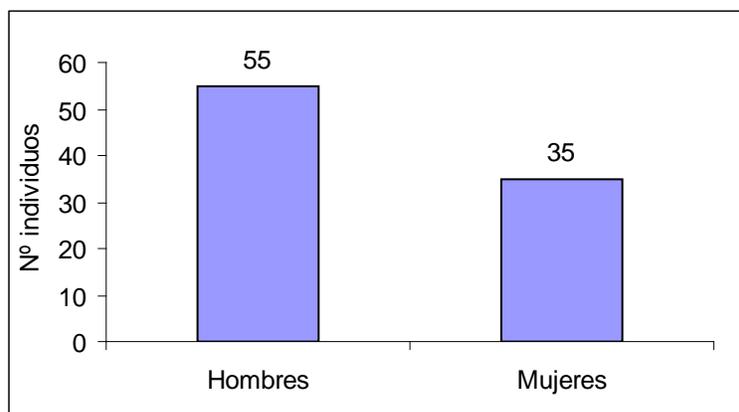


Figura 22. Individuos totales a estudio para cada sexo.

Diversos estudios han concluido que en diferentes poblaciones con hábitos y factores de riesgo similares presentan grandes diferencias en la prevalencia a EAo-d, por lo que sugieren que deben existir factores genéticos que produzcan EAo-d (6, 18, 21, 22), aunque en nuestro caso, con los datos que tenemos hasta el momento no podemos establecer una relación entre la presencia de polimorfismos con el desarrollo de EAo-d.

Para el polimorfismo rs3804099, que en nuestros casos controles encontramos una tendencia a la significancia, estudios recientes lo han relacionado con una alta tasa de

morbilidad por sepsis y con disfunción multiorgánica tras un traumatismo (24). Para que nosotros podamos establecer alguna relación debemos ampliar nuestro estudio.

Para el polimorfismo rs 5743708 (R753Q) hemos visto que las mujeres tienen una mayor frecuencia alélica para el alelo menos frecuente (A) (ver tabla 3), al igual que ocurre en estudios recientes, en los que asocian la presencia de este polimorfismo con el desarrollo de reestenosis, que es más frecuente en mujeres que en hombres (6).

	GG	AG	AA	Frecuencia alélica G	Frecuencia alélica A	Total
Mujeres	0,906	0,093	0	0,953	0,047	32
	90,625% (29)	9,375% (3)	0			
Hombres	0,981	0,018	0	0,99	0,00925	54
	98,14 (53)	1,86 (1)	0			

Tabla 3. Frecuencias alélicas y genotípicas para R753Q en nuestra población.

Otra de los factores de riesgo asociados con EAo-d es la hipercolesterolemia. Aunque diversos estudios establecen una relación entre hipercolesterolemia y EAo-d (4, 13, 14, 18), nosotros no hemos encontrado ninguna relación entre la presencia de polimorfismos-hipercolesterolemia-EAo-d, ni tampoco con los niveles de LDL.

En estudios recientes han asociado el polimorfismo en TLR2 Pro631His (rs5743704) con la positividad de anticuerpos antitopoisomerasa, que produce un aumento en los niveles de los mediadores inflamatorios y con el desarrollo de hipertensión pulmonar arterial (16), en el presente estudio este polimorfismo no ha podido relacionarse con el desarrollo de estenosis aórtica degenerativa.

CONCLUSIONES

1. De los 10 polimorfismos estudiados 9 están en equilibrio de Hardy-Weinberg.
2. No podemos concluir que la variación genética en el TLR2 esté asociada a la susceptibilidad de padecer EAo-d debido a que tras haber estudiado 90 pacientes con EAo-d y 17 controles sanos no hemos podido establecer ninguna relación entre la presencia o ausencia de los polimorfismos estudiados con el desarrollo de EAo-d.
3. Consideramos necesario ampliar el estudio principalmente en el grupo de los controles para obtener datos más concluyentes, ya que para ello necesitamos realizar el estudio en 300 pacientes enfermos y en 300 sanos.

BIBLIOGRAFÍA

1. B. Fendley Steward, David Siscovick, Bonnie K., Julius M. Gardin, John S. Gottdiener, Vivienne E. Smith, Dalane W. Kitzman. Clinical Factors associated with calcific aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol* 1997;29:630-4
2. O. Takeuchi and S. Akira. Pattern Recognition Receptors and Inflammation.
3. CM Otto, J. Kuusisto, DD Reichenbach, AM Gown and KD O'Brien. Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation*. 1994;90:844-853
4. Hoagland PM, Cook EF, Flatley M Walker C, Glodman L. Case-control analysis of risk factors for presence of aortic stenosis in adults (age 50 years or older). *Am J Cardiol* 1985;55:744-7
5. López J et al. Viral and bacterial patterns induce TLR-mediated sustained inflammation and calcification in aortic valve interstitial cells. *Int J Cardiol* DOI:10.1016/j.ijcard.2010.12.089
6. Hamann L, et al. A frequent Toll-like receptor (TLR)-2 polymorphism is a risk factor for coronary restenosis. *Journal of Molecular Medicine*. 2005; 83:478-85.12
7. ACC/AHA 2006 Guidelines for the Management of patients with valvular heart disease a report of the american college of cardiology american heart association task force on practice guidelines (Writing committee to revise the 1998 guidelines for the management of patients with valvular heart disease). Developed in collaboration with the Society of Cardiovascular Angiography and Interventions and the Society of Thoracic Surgeons.
8. Linda K. Curtiss and Peter S. Tobias. Emerging role of Toll-like receptors in atherosclerosis. *Journal of Lipid Reseach*. April 2009.
9. Martínez- Córdova, Zuzet; Calzadilla-Lugo, Flora; Artiles-Valor, Adriana. Papel de los polimorfismos genéticos de los receptores de peaje (Toll-R) en la enfermedad y en el trasplante. *Bioquímica*, Vol. 34, Núm. 2, abril-junio, 2009, pp. 83-94
10. Xiaoping Yang. Et al. Pro-osteogenic phenotype of human aortic valve interstitial cells is associated with higher levels of toll-like receptors 2 and 4 and enhanced expresión of bone morphogenetic protein 2. *Journal of the American College of Cardiology*. Vol. 53, No. 6, 2009.
11. Rolf Spirig, Janice Tsui, and Sidney Shaw. The emerging role of TLR and innate immunity in cardiovascular disease. *Cardiology Research and Practice*. Volumen 2
12. Bustamante J. et al. Toll-like receptors 2 R753Q Polymorphisms are associated with an increased risk of infective endocarditis. *Rev Esp Cardiol*. 2011;64 (11): 1056-1059.
13. Jan Stritzke, et al. Association between degenerative aortic valve disease and long-term exposure to cardiovascular risk factors: results of the longitudinal population-based KORA/MONICA survey. *European Heart Journal* (2009) 30, 2044-2053
14. Pilar Tornos. Nuevos aspectos de la valvulopatía aórtica. *Rev. Esp Cardiol* 2001; 54 [Supl 1]: 17-21
15. Azpitarte J, Alonso A, García Gallego F, González Santos JM, Pare C, Tello A. Guías de práctica clínica de la Sociedad Española de Cardiología en valvulopatías. *Rev Esp Cardiol* 2000; 53: 1209-1278.
16. J. C. A. Brons, et al. A rare polymorphism in the gene for Toll-like receptor 2 is associated with systemic sclerosis phenotype and increases the production of inflammatory mediators. *Arthritis & Rheumatism*. Vol. 64, No. 1, January 2012, pp 264-271.
17. Douglas L. Mann. The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system. *Circulation Research*. 2011;108:1122-1132.
18. Nalini M. Rajamannan. Calcific Aortic Stenosis: Lessons learned from experimental and clinical studies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29;162-168.
19. Blase A Carabello, Walter J Paulus. Aortic stenosis. *Lancet* 2009; 373:956-66
20. *Inmunología. Biología y patología del sistema inmunitario*. 4º Edición. ISBN 978-84-9835-003-6.

21. G Le Gal, et al. Heterogeneous geographic distribution of patients with aortic valve stenosis: arguments for new aetiological hipótesis. *Heart* 2005;91:247-249.
22. Benjamin D. Horne, et al. Evidence for a heritable component in death resulting from aortic and mitral valve disease. *Circulation* 2004;110:3143-3148.
23. Chávez Daniela. Receptores Tipo Toll (Toll like receptors) *Rev. latinoam. actual. bioméd.* 2007; 1: 3-9)
24. Park HJ, et al. Association of toll-like receptor 2 polymorphisms with National Institute of Health Stroke Scale scores of ischemic stroke patients. *J Mol Neurosci.* 2012 Mar;46(3):536-40